

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAROLINE NOVAK SAKAKIBARA

GELIFICAÇÃO TÉRMICA DA XILOGLUCANA INDUZIDA POR
DEGALACTOSILAÇÃO E POR ADIÇÃO DE SAL COSMOTRÓPICO: ASPECTOS
CINÉTICOS E ESTRUTURAIS

CURITIBA

2018

CAROLINE NOVAK SAKAKIBARA

GELIFICAÇÃO TÉRMICA DA XILOGLUCANA INDUZIDA POR
DEGALACTOSILAÇÃO E POR ADIÇÃO DE SAL COSMOTRÓPICO: ASPECTOS
CINÉTICOS E ESTRUTURAIS

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção
do grau de doutora em Química, no Curso de Pós-
Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas da
Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Rilton Alves de Freitas

CURITIBA

2018

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

S132g

Sakakibara, Caroline Novak

Gelificação térmica da xiloglucana induzida por degalactosilação e por adição de sal cosmotrópico: aspectos cinéticos e estruturais [recurso eletrônico] / Caroline Novak Sakakibara. – Curitiba, 2018.

Tese - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2018.

Orientador: Rilton Alves de Freitas.

1. Galactose. 2. Polissacarídeos. 3. Monossacarídeos. 4. Reações químicas. I. Universidade Federal do Paraná. II. Freitas, Rilton Alves de. III. Título.

CDD: 541.39

Bibliotecária: Vanusa Maciel CRB- 9/1928

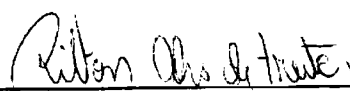
TERMO DE APROVAÇÃO

**GELIFICAÇÃO TÉRMICA DA XILOGLUCANA INDUZIDA POR
DEGALACTOSILAÇÃO E SAL COSMOTRÓPICO: ASPECTOS
CINÉTICOS E ESTRUTURAIS**

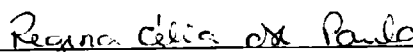
por

CAROLINE NOVAK SAKAKIBARA

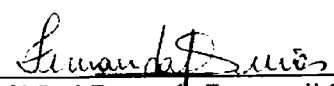
Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Química, pela Comissão Examinadora composta por:



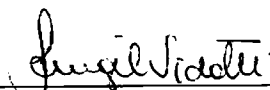
Prof. Dr. Rilton Alves de Freitas
Orientador
Dep. de Química – UFPR



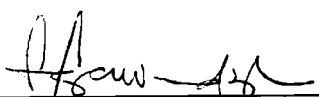
Prof.^a Dr.^a Regina Célia Monteiro de Paula
Dep. de Química Orgânica e Inorgânica – UFC



Prof.^a Dr.^a Fernanda Fogagnoli Simas
Dep. de Biologia Celular – UFPR



Prof.^a Dr.^a Izabel Cristina Riegel Vidotti Miyata
Dep. de Química – UFPR



Prof.^a Dr.^a Sônia Faria Zawadzki
Dep. de Química – UFPR

Curitiba, 27 de abril de 2018.

Dedico este trabalho a Deus, à minha
mãe Zilma Soeli Novak e ao meu pai
Seiji Sakakibara, à minha avó, que não
está mais entre nós, ao meu orientador
Profº Dr. Rilton Alves de Freitas, e a
todos que estiveram comigo nessa
caminhada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida, pelo tempo de graça, por se fazer presente em todos os momentos, sejam eles maus ou bons. Agradeço por esses anos entre o mestrado e o doutorado que me fizeram entender o que realmente é importante.

À minha mãe, pelo apoio nos estudos e a compreensão pelas muitas ausências. Pelo amor e carinho dedicado.

Ao meu pai por, apesar de estar tão longe, procurar se fazer presente.

Ao meu orientador Profº Dr. Rilton Alves de Freitas. Agradeço pelos muitos anos trabalhando junto, pelos incentivos e puxões de orelha. Por abrir as portas do Biopol, pela dedicação e paciência em ensinar. O tempo passou rápido, entretanto o conhecimento adquirido nesses anos no Biopol, permanecerão por longos anos. Por isso, apesar dos muitos desafios e momentos difíceis, a busca pelo conhecimento sempre é válida. Obrigada por compartilhar um pouco do seu conhecimento comigo.

Aos colegas do Biopol que ao longo desses anos se fizeram presentes e contribuíram de alguma forma. Especialmente à Renata Silva e à Helen Bassani pela amizade formada.

À Profª Dra. Izabel Cristina Riegel Vidotti Miyata por ao longo do doutorado ter contribuído significativamente no desenvolvimento do trabalho, através das correções dos relatórios e aceite por participar da banca de qualificação. Agradeço também por ter sido uma das primeiras pessoas a me acolher no departamento de química, por esses anos de convívio desde a Iniciação Científica.

À Profª Dra. Maria Rita Sierakowski, ao Profº Dr. Christophe Chassenieux e ao Profº Dr. Taco Nicolai pelas contribuições realizadas no presente estudo.

À Profª Dra. Jaísa Fernandes Soares pela dedicação a coordenação do curso de Pós-graduação, pela organização e empenho que levaram o curso de Pós-graduação em Química da UFPR chegar ao conceito 7.

Ao Marcelino Câmara e a Fernanda Gabardo Dias Pinheiro que com muito empenho e dedicação trabalham na coordenação do programa.

A todos os professores e colegas do Departamento de Química que contribuíram de alguma maneira para a minha formação e desenvolvimento deste trabalho.

A CAPES pelo auxílio financeiro.

“O temor do SENHOR é a chave da sabedoria e conhecer a Divindade é alcançar o pleno sentido do conhecimento!”

Provérbios 9: 10

Bíblia Sagrada

RESUMO

Soluções aquosas de xiloglucana (XG) nativa extraídas das sementes de *H. courbaril* (XGJ) formaram géis durante a remoção enzimática de resíduos de galactose, presentes na cadeia, à temperatura de 50 °C, pela adição da β -galactose. A concentração enzimática influenciou a cinética de gelificação, mas não a rigidez do gel. O módulo de elasticidade dos géis aumentou com o acréscimo da concentração de XG de 10 Pa, em concentração de 5 mg mL⁻¹, para 10³ Pa, a 20 mg mL⁻¹. A gelificação da solução iniciou quando 10% da galactose presente na cadeia foi removida, e parou quando ocorreu a remoção de aproximadamente 65% da galactose. Entretanto, a rigidez do gel continuou a aumentar lentamente após a remoção da galactose. O resfriamento causou o rompimento da rede reticulada, levando a uma diminuição do módulo de elasticidade dos géis. A densidade dos pontos de reticulação crítica na percolação das cadeias de XGJ é maior se as cadeias forem mais longas, o que significa que a temperatura crítica na qual há a formação do gel é menor quando a massa molar de XGJ for maior. O gel formado a partir da XGJ com $M_w = 3,0 \times 10^6$ g mol⁻¹, após a formação do gel a 50 °C e resfriamento a 10 °C, não se desfaz, mesmo em baixas temperaturas. Entretanto, o gel obtido com $M_w = 1,0 \times 10^5$ g mol⁻¹, em baixas temperaturas, houve reversão ao estado sol, aonde não há a presença da rede gelificada ou existe a formação de poucos pontos de reticulação insuficientes para a formação do gel. A formação da rede gelificada também foi possível a partir de soluções aquosas de XG extraída de *H. courbaril* utilizando-se o sal cosmotrópico Na₂SO₄. A adição 1 mol L⁻¹ de Na₂SO₄ à XGJ nativa, fez com que houvesse a formação de hidrogéis mais elásticos, entretanto que precisam permanecer um tempo prolongado a baixas temperaturas para que ocorra a despercolação da rede. Em concentrações menores de Na₂SO₄ a 0,75 mol L⁻¹, 0,65 mol L⁻¹, 0,5 mol L⁻¹, foi possível obter hidrogéis que apresentassem termo-reversão dentro da escala de tempo e temperatura trabalhado nas análises reológicas, contudo com um menor grau de componente elástico. Em concentrações menores que 0,5 mol L⁻¹ de Na₂SO₄ não houve a formação do hidrogel. Dentre os ânions cosmotrópicos avaliados (SO₄²⁻, HPO₄²⁻, Cl⁻, H₂PO₄⁻, NO₃⁻) os únicos que foram capazes de promover a formação da rede gelificada estável foram os SO₄²⁻ e HPO₄²⁻ (H₂PO₄⁻ nas condições experimentais de pH formou ~ 50% de HPO₄²⁻). Nas análises de microscopia confocal por varredura a laser foi possível observar a formação de grandes agregados e micro fibrilas na rede gelificada da XGJ com Na₂SO₄ a 1 mol L⁻¹ enquanto que nas demais apenas foi possível ver a formação de micro fibrilas. Nas imagens de MEV viu-se que estas são formadas por pequenas partículas de XGJ que se ligam umas às outras. Nas análises térmicas observou-se que a formação do gel da XGJ com Na₂SO₄ a 1 mol L⁻¹ é diferente da rede formada com menores concentrações. A mudança de conformação após a adição de Na₂SO₄ à solução de XGJ foi observada utilizando o CD, o aumento da adição de sal levou a uma maior mudança na conformação. Essa mudança expôs os segmentos hidrofóbicos presentes naturalmente na cadeia de XGJ, promovendo a reticulação sem a necessidade da hidrólise enzimática com β -gal, tornando este processo mais viável economicamente a produção de hidrogéis termo-sensíveis ou termo-reversíveis de xiloglucana.

Palavras-chaves: Xiloglucana de Jatobá 1. Hidrogéis termo-sensíveis 2. Hidrólise enzimática β -gal 3. Sais cosmotrópicos 4.

ABSTRACT

Aqueous native XG solutions extracted from the seeds of *H. courbaril* (XGJ) formed gels during the degalactosylation at 50 °C induced by addition of the β -gal enzyme. Enzyme concentration influenced gelation kinetics, but not gel stiffness. The gel modulus of elasticity increased with increasing concentration of XGJ from 10 Pa at concentration of 5 mg mL⁻¹ to 10³ Pa at concentration of 20 mg mL⁻¹. Gelling started at very low degrees of degalactosylation (<10%). Degalactosylation stopped at a degree of about 65%, but gel stiffness continued to increase slowly. The cooling caused the breakage of the crosslinks, leading to a decrease in the modulus of elasticity of the gels. The critical crosslinking density for percolating XGJ chains is greater if the chains are longer, which means that the critical temperature at which the gel formation is less when the molar mass of XGJ is higher. For the XGJ with $M_w = 3.0 \times 10^5$ g mol⁻¹, the gelled network was maintained even at temperatures 10 °C, but with $M_w = 1.0 \times 10^5$ g mol⁻¹ there was reversion to the sol state at low temperatures. It was possible to form a gelled network from aqueous solutions of XG extracted from *H. courbaril* using the Na₂SO₄ kosmotropic salt. The addition of 1 mol L⁻¹ of Na₂SO₄ to the native XGJ, resulted in the formation of more elastic hydrogels, however, which require a longer time at low temperatures for the net to escape. At lower concentrations of 0.75 mol L⁻¹, 0.65 mol L⁻¹, 0.5 mol L⁻¹, it was possible to obtain hydrogels that presented thermo-reversion within the time and temperature range worked in the rheological analyzes, but with a smaller elastic component. At concentrations less than 0.5 mol L⁻¹ of Na₂SO₄ there wasn't formation of the hydrogel. Among the evaluated kosmotropic anions (SO₄²⁻, HPO₄²⁻, Cl⁻, H₂PO₄⁻, NO₃⁻), the only ones that were able to promote formation of the stable gelled network were SO₄²⁻ and HPO₄²⁻ (H₂PO₄⁻ forms 50% of HPO₄²⁻ in the pH of the gel). In the analysis of confocal microscopy by laser scanning it was possible to observe the formation of large aggregates and micro fibrils in the gelled network of XGJ with Na₂SO₄ at 1 mol L⁻¹, while in the others it was only possible to see the formation of micro fibrils. In the MEV images it was seen that these are formed by small particles of XGJ that are joined to each other. In the thermal analyzes it was observed that the formation of the gelled network of XGJ with Na₂SO₄ at 1 mol L⁻¹ is different from the constitution of the lower concentrations. The change in conformation after the addition of Na₂SO₄ to the solution of XGJ were observed using the CD, increasing salt addition led to a greater change in conformation. This change exposes the naturally hydrophobic sequences in the XGJ chain, promoting cross-linking without the need for enzymatic hydrolysis with β -gal, making this process more economically feasible to produce thermo-sensitive or thermo-reversible hydrogels of xyloglucan.

Key words: Jatoba xyloglucan 1. Thermosensitive hydrogels 2. β -gal enzymatic hydrolysis 3. Cosmotropic salts 4.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-------------|--|----|
| FIGURA 1 - | REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA TRANSIÇÃO DO ESTADO SOL (a) –GEL (c)..... | 28 |
| FIGURA 2 - | ESQUEMA DA CLASSIFICAÇÃO DOS HIDROGÉIS..... | 29 |
| FIGURA 3 - | TRANSIÇÃO SOL-GEL EM RESPOSTA A MUDANÇA DE TEMPERATURA..... | 31 |
| FIGURA 4 - | REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DE UM HIDROGEL TERMO-SENSITIVO INJETÁVEL..... | 32 |
| FIGURA 5 - | REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA CADEIA DA XILOGLUCANA PROVENIENTE DO ENDOSPERMA DAS SEMENTES DE JATOBÁ..... | 34 |
| FIGURA 6 - | SEMENTES DE JATOBÁ..... | 35 |
| FIGURA 7 - | REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS ESTRUTURAS DOS OLIGOSSACARÍDEOS PRESENTES NA XILOGLUCANA DE JATOBÁ. (A) XXG, (B) XXXG, (C) XLXG, (D) XXLXG, (E) XLLG, (F) XXXXG, (G) XXXLG, (H) XLXXG e (I) XXLXG*..... | 36 |
| FIGURA 8 - | REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA COM β -GAL DA XILOGLUCANA DE JATOBÁ. O EFEITO DO TRATAMENTO COM β -GAL RESULTANDO EM REMOÇÃO PARCIAL DA GALACTOSE PRESENTE NA RAMIFICAÇÃO DA CADEIA PRINCIPAL DO POLISSACARÍDEO..... | 39 |
| FIGURA 9 - | ÂNIONS E CÁTIOS DA SÉRIE HOFMEISTER ORDENADOS DE ACORDO COM SEU EFEITO CAOTRÓPICO OU COSMOTRÓPICO..... | 43 |
| FIGURA 10 - | ESQUEMA ILUSTRATIVO DA ESTRUTURA DA ÁGUA DEVIDO AO MAIOR OU MENOR NÚMERO DE LIGAÇÕES DE HIDROGÊNIO..... | 44 |
| FIGURA 11 - | REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA ESTRUTURA DE MOLÉCULAS DE ÁGUA AO REDOR DO ÂNION, MOSTRANDO O EFEITO COSMOTRÓPICO..... | 45 |
| FIGURA 12 - | DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DO CISALHAMENTO DE UMA AMOSTRA..... | 48 |
| FIGURA 13 - | REPRESENTAÇÃO DO MODELO MOLA E AMORTECEDOR... | 49 |
| FIGURA 14 - | MODELO MOLA E AMORTECEDOR DE MAXWELL PARA MATERIAIS VISCOELÁSTICOS..... | 51 |
| FIGURA 15 - | TENSÃO (STRESS) E DEFORMAÇÃO (STRAIN) OSCILATÓRIA PARA SÓLIDOS HOOKEANOS E LÍQUIDOS NEWTONIANOS..... | 52 |
| FIGURA 16 - | EXEMPLOS DE EVENTOS ENDOTÉRMICOS E EXOTÉRMICOS QUE PODEM SER OBSERVADOS ATRAVÉS DAS ANÁLISES DE CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC)..... | 54 |
| FIGURA 17 - | REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO COMPARTIMENTO DO μ -DSC POR COMPENSAÇÃO DE ENERGIA..... | 55 |

| | | |
|--------------|--|----|
| FIGURA 18 - | ESQUEMA DA LUZ CIRCULAR POLARIZA..... | 56 |
| FIGURA 19 - | SINAL DO ESPECTRO DE CD PARA OS DIFERENTES TIPOS DE ESTRUTURAS SECUNDÁRIAS DE PROTEINAS..... | 58 |
| FIGURA 20 - | G' E G'' EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA XGJ ($M_w = 3,0 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$) NA CONCENTRAÇÃO DE 10 mg mL^{-1} E β -GAL NA CONCENTRAÇÃO DE 16 U mL^{-1} . O TEMPO DE GELIFICAÇÃO (tg) ESTÁ INDICADO NA FIGURA..... | 66 |
| FIGURA 21a - | DEPENDÊNCIA DO TEMPO DO G' DURANTE A DEGALACTOSILAÇÃO A 50°C PARA A XILOGLUCANA COM $M_w = 3 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$ EM SOLUÇÃO COM $C = 10 \text{ mg mL}^{-1}$ E EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE β -GAL INDICADAS NA FIGURA..... | 68 |
| FIGURA 21b - | RESULTADOS MOSTRADOS NA FIGURA 21a. PLOTADOS EM FUNÇÃO DE t/tg . A PORCENTAGEM DE DEGALACTOSILAÇÃO NA $C_{\text{ENZ}} = 16 \text{ U mL}^{-1}$ É MOSTRADA EM COMPARAÇÃO COM A FUNÇÃO DE t/tg NA MESMA FIGURA (DIAMANTES VERDES)..... | 68 |
| FIGURA 21c - | $1/\text{tg}$ EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ENZIMA β -GAL PARA XILOGLUCANA EM SOLUÇÃO A $C = 10 \text{ mg mL}^{-1}$ E $T = 50^\circ \text{C}$ | 68 |
| FIGURA 22 - | CONCENTRAÇÃO EM PORCENTAGEM DO MONOSSACÁRIDEO DE GALACTOSE REMOVIDO AO LONGO DA REAÇÃO ENZIMÁTICA COM β -Gal A $C_{\text{ENZ}} = 16 \text{ U mL}^{-1}$ PELO TEMPO EM SEGUNDOS. DADOS OBTIDOS ATRAVÉS DA TÉCNICA DE HPAEC..... | 69 |
| FIGURA 23 - | EVOLUÇÃO DO MÓDULO DE ARMAZENAMENTO COM O TEMPO A 50°C APÓS ADIÇÃO DE 6.4 U mL^{-1} DA β -GAL, PARA SOLUÇÕES DE XGJ COM $M_w = 3 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$ COM SOLUÇÕES EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES COMO INDICADO NA FIGURA..... | 70 |
| FIGURA 24 - | G' (a) E G'' (b) EM FUNÇÃO DA FREQUÊNCIA ANGULAR PARA SOLUÇÕES DE XILOGLUCANA COM $M_w = 3,0 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$ EM $C = 10 \text{ mg mL}^{-1}$ OBTIDO EM DIFERENTES VALORES DE t/tg INDICADOS NA FIGURA..... | 71 |
| FIGURA 25 - | G' (a) e G'' (b) EM FUNÇÃO DA FREQUÊNCIA ANGULAR PARA SOLUÇÕES DE XILOGLUCANA SEM ENZIMA (-■-) E COM A ENZIMA PREVIAMENTE DESNATURADA (-●-) $C_{\text{ENZ}} = 16 \text{ U mL}^{-1}$ | 72 |
| FIGURA 26 - | MÓDULO ELÁSTICO DOS GÉIS FORMADOS POR XGJ, $M_w = 3,0 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$ A $C = 5 \text{ mg mL}^{-1}$ E 10 mg mL^{-1} APÓS TRATAMENTO ENZIMÁTICO A $t/\text{tg} \approx 87$ DURANTE O AQUECIMENTO E SUBSEQUENTES CICLOS DE RESFRIAMENTO A UMA TAXA DE $0,5^\circ \text{C min}^{-1}$ | 73 |
| FIGURA 27a - | G' E G'' EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA XGJ ($M_w = 3,0 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$) NA CONCENTRAÇÃO DE 10 mg mL^{-1} , $C_{\text{ENZ}} = 16 \text{ U mL}^{-1}$ TEMPO DE REAÇÃO 16 HORAS E REAÇÃO EM pH 7,0. O TEMPO DE GELIFICAÇÃO (tg) ESTÁ INDICADO NA FIGURA..... | 74 |

| | | |
|--------------|--|----|
| FIGURA 27b - | RAMPA DE AQUECIMENTO E RESFRIAMENTO APÓS TRATAMENTO ENZIMÁTICO MOSTRADO, TAXA DE 0,5 °C min ⁻¹ | 74 |
| FIGURA 28a - | MODOS DE CISALHAMENTO EM FUNÇÃO DO ESTRESSE DE OSCILAÇÃO EM $\omega = 1 \text{ rad s}^{-1}$ PARA O GEL DE XGJ COM $M_w = 3,0 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$ EM $C = 10 \text{ mg mL}^{-1}$ APÓS O TRATAMENTO ENZIMÁTICO ($t/t_g = 87$). O ESTRESSE FOI AUMENTADO A UMA TAXA DE 0,25 Pa POR SEGUNDO. XGJ TRATADA DURANTE $6 \times 10^4 \text{ s}$ COM $6,4 \text{ U mL}^{-1}$ DE β -gal..... | 75 |
| FIGURA 28b - | RECUPERAÇÃO DOS MÓDULOS DE CISALHAMENTO COM O TEMPO APÓS A APLICAÇÃO DA RAMPA DE TENSÃO MOSTRADA NA FIGURA 28a..... | 75 |
| FIGURA 29 - | COMPARAÇÃO DOS MÓDULOS DE CISALHAMENTO DE UM GEL DE XG ($M_w 3,0 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$) DURANTE CICLOS SUBSEQUENTES DE AQUECIMENTO E ARREFECIMENTO A UMA TAXA DE VELOCIDADE DE 0,5 °C min ⁻¹ . ANTES DO CORTE E DEPOIS DE SEREM SUBMETIDOS A UMA RAMPA DE TENSÃO, VER FIG. 28a. O GEL FOI FORMADO A $C = 5 \text{ mg mL}^{-1}$ E $C = 10 \text{ mg mL}^{-1}$, APÓS TRATAMENTO ENZIMÁTICO EM $t/t_g = 87,3$, O GEL FOI DEIXADO RECUPERAR DURANTE 10^4 s A 50 °C..... | 76 |
| FIGURA 30a- | MODOS DE CISALHAMENTO DE UM GEL DE XG ($M_w 3,0 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$) EM FUNÇÃO DA FREQUÊNCIA DE OSCILAÇÃO EM $\omega = 1 \text{ rad s}^{-1}$. O ESTRESSE FOI AUMENTADO A UMA TAXA DE 0,25 Pa POR SEGUNDO. O GEL FOI FORMADO COM $C = 10 \text{ mg mL}^{-1}$ APÓS TRATAMENTO ENZIMÁTICO EM $t/t_g = 87,3$ E POSTERIORMENTE SUBMETIDO A UMA RAMPA DE TENSÃO, VER FIG. 28a. AS MEDIDAS FORAM FEITAS DEPOIS DE PERMITIR QUE OS GÉIS QUE SOFRERAM CISALHAMENTO SE RECUPERASSEM DURANTE 10^4 s A 50 °C..... | 76 |
| FIGURA 30b- | COMPARAÇÃO DOS MÓDULOS DE CISALHAMENTO DEPENDENTES DA FREQUÊNCIA DOS GÉIS DE XGJ PARCIALMENTE RECUPERADOS APÓS A PRIMEIRA E SEGUNDA RAMPAS DE CISALHAMENTO MOSTRADAS NAS FIGURAS 28a E 30a, RESPECTIVAMENTE..... | 76 |
| FIGURA 31 - | PERFIL DE ELUIÇÃO DA CROMATOGRAFIA POR EXCLUSÃO DE TAMANHO (SEC) PARA A XILOGLUCANA E AS FRAÇÕES HIDROLISADAS COM TEMPO DE HIDRÓLISE XG 0,5h E 20 h..... | 78 |
| FIGURA 32 - | G' E G'' EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA XGJ HIDROLISADA COM $M_w = 8,0 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$ (a) e $M_w = 1,0 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$ (b) NA CONCENTRAÇÃO DE $C = 10 \text{ mg mL}^{-1}$ E $C_{ENZ} = 16 \text{ U mL}^{-1}$, TEMPO DE REAÇÃO 16 HORAS. O TEMPO DE GELIFICAÇÃO ESTÁ INDICADO NA FIGURA (t_g)..... | 79 |

| | | |
|--------------|---|----|
| FIGURA 33a - | MÓDULO DE ARMAZENAMENTO EM $\omega = 6,23 \text{ rad s}^{-1}$ DO GEL DE XGJ EM DIFERENTES TEMPERATURAS DURANTE O RESFRIAMENTO DE 50°C A 10°C E SUBSEQUENTE AQUECIMENTO A 50°C . O GÉL FOI FORMADO EM CONCENTRAÇÃO DE $C = 10 \text{ mg mL}^{-1}$, ATRAVÉS DA REAÇÃO DE DEGALACTOSILAÇÃO DA XGJ HIDROLISADA COM $M_w = 8,0 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$ | 80 |
| FIGURA 33b - | GÉL FORMADO EM CONCENTRAÇÃO DE $C = 10 \text{ mg mL}^{-1}$, ATRAVÉS DA REAÇÃO DE DEGALACTOSILAÇÃO DA XGJ HIDROLISADA COM $M_w = 1,0 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$. MÓDULO DE ARMAZENAMENTO EM $\omega = 6,23 \text{ rad s}^{-1}$, RAMPA DE AQUECIMENTO DE 50°C A 10°C E RESFRIAMENTO ATÉ 50°C | 80 |
| FIGURA 34a - | MÓDULO DE ARMAZENAMENTO EM $\omega = 6,23 \text{ rad s}^{-1}$ DO GEL DE XGJ EM DIFERENTES TEMPERATURAS DURANTE O RESFRIAMENTO DE 50°C A 10°C E SUBSEQUENTE AQUECIMENTO A 50°C . O GÉL FOI FORMADO EM CONCENTRAÇÃO DE $C = 10 \text{ mg mL}^{-1}$, ATRAVÉS DA REAÇÃO DE DEGALACTOSILAÇÃO DA XGJ HIDROLISADA COM $M_w = 8,0 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$ | 81 |
| FIGURA 34b - | DEPENDÊNCIA DA FREQUÊNCIA DO MÓDULO DE ARMAZENAMENTO EM DIFERENTES TEMPERATURAS DURANTE O AQUECIMENTO À $C = 10 \text{ mg mL}^{-1}$, FORMADO POR DESGALACTOLIZAÇÃO DE XGJ HIDROLISADO SOB AQUECIMENTO COM $M_w = 1,0 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$ | 81 |
| FIGURA 35 - | MÓDULO DE ARMAZENAMENTO EM $\omega = 6,23 \text{ rad s}^{-1}$ DO GEL DE XGJ EM DIFERENTES TEMPERATURAS DURANTE O AQUECIMENTO DE 10°C A 80°C E SUBSEQUENTE ARREFECIMENTO A 10°C . OS GÉIS FORAM FORMADOS EM $C = 10 \text{ mg mL}^{-1}$ POR DESGALACTOLIZAÇÃO DA XGJ HIDROLISADA COM $M_w = 1,0 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$. RAMPAS DE AQUECIMENTO E ARREFECIMENTO LOGO APÓS AS RAMPAS DE RESFRIAMENTOS E AQUECIMENTOS MOSTRADAS NA FIGURA 33b..... | 82 |
| FIGURA 36 - | $G'(-\bullet-)$ E $G''(-\blacksquare-)$ EM FUNÇÃO DA FREQUÊNCIA ANGULAR E FOTOS DA XGJ NATIVA $C = 10 \text{ mg mL}^{-1}$ (a), E COM Na_2SO_4 NAS CONCENTRAÇÕES DE $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (b), $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ (c) E 1 mol L^{-1} (d) À TEMPERATURA DE 10°C | 91 |
| FIGURA 37 - | $G'(-\bullet-)$ E $G''(-\blacksquare-)$ EM FUNÇÃO DA FREQUÊNCIA ANGULAR E FOTOS DA XGJ NATIVA $C = 10 \text{ mg mL}^{-1}$ (a), E COM Na_2SO_4 NAS CONCENTRAÇÕES DE $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (b), $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ (c) E 1 mol L^{-1} (d) A TEMPERATURE DE 50°C | 92 |
| FIGURA 38 - | G' E G'' COMO FUNÇÃO DO TEMPO PARA XGJ $C = 10 \text{ mg mL}^{-1}$ CONTENDO Na_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ (a); $0,65 \text{ mol L}^{-1}$ (b), $0,75 \text{ mol L}^{-1}$ (c) E 1 mol L^{-1} (d) EM VELOCIDADE ANGULAR DE $\omega = 6,28 \text{ rad s}^{-1}$ A 50°C | 94 |
| FIGURA 39 - | DEPENDÊNCIA DE $1/T_g$ EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE Na_2SO_4 | 94 |

| | | |
|--------------|---|-----|
| FIGURA 40 - | MÓDULO DE ARMAZENAMENTO (-□-) E PERDA (-○-) EM $\omega = 6,28 \text{ rad s}^{-1}$ DE XGJ, $C = 10 \text{ mg mL}^{-1}$ EM Na_2SO_4 A $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (a); $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ (b); $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ (c), $0,65 \text{ mol L}^{-1}$ (d), $0,75 \text{ mol L}^{-1}$ (e) e 1 mol L^{-1} (f) EM DIFERENTES TEMPERATURAS DURANTE O ARREFECIMENTO DE 50°C A 10°C E SUBSEQUENTE AQUECIMENTO A 50°C . AS AMOSTRAS FORAM MANTIDAS DURANTE 1,5 h EM CADA TEMPERATURA, ANTES DOS MÓDULOS DE CISALHAMENTO SEREM DETERMINADOS..... | 96 |
| FIGURA 41 - | G' (LINHA PRETA) E G'' (LINHA CINZA) PELO TEMPO (s), $\omega = 1,0 \text{ rad s}^{-1}$. DURANTE RESFRIAMENTO DE 60°C ATÉ 10°C (LINHA AZUL) PARA A AMOSTRA DE XGJ COM Na_2SO_4 A 1 mol L^{-1} . DADOS OBTIDOS APÓS FASE LAG DE 16 HORAS. A RAMPA FOI CONSTRUÍDA COM A AMOSTRA PERMANECENDO DURANTE 1,5 HORA A UMA DADA TEMPERATURA E SUBSEQUENTE ABAIXAMENTO A CADA PASSO DE 10°C . NA TEMPERATURA DE 10°C A AMOSTRA PERMANECIU DURANTE 8 HORAS SOB MONITORAMENTO..... | 97 |
| FIGURA 42 - | G' (LINHA PRETA) E G'' (LINHA CINZA) PELO TEMPO (s), $\omega = 1,0 \text{ rad s}^{-1}$ DURANTE RESFRIAMENTO DE 50°C ATÉ 10°C E POSTERIOR AQUECIMENTO ATÉ 50°C (LINHA AZUL) PARA AS AMOSTRAS DE XGJ COM Na_2SO_4 A 1 mol L^{-1} (a) $0,65 \text{ mol L}^{-1}$ (b). DADOS OBTIDOS APÓS FASE LAG DE 16 HORAS. A RAMPA FOI CONSTRUÍDA COM A AMOSTRA PERMANECENDO DURANTE 1,5 HORA A UMA DADA TEMPERATURA E SUBSEQUENTE ABAIXAMENTO A CADA PASSO DE 10°C | 98 |
| FIGURA 43 - | MÓDULO DE ARMAZENAMENTO E PERDA EM $\omega = 0,92 \text{ rad s}^{-1}$ DE XGJ, $C = 10 \text{ mg mL}^{-1}$ COM Na_2SO_4 A $0,65 \text{ mol L}^{-1}$ EM DIFERENTES TEMPERATURAS DURANTE O ARREFECIMENTO DE 50°C A 10°C E SUBSEQUENTE AQUECIMENTO A 50°C . AS AMOSTRAS FORAM MANTIDAS DURANTE 1,5 h EM CADA TEMPERATURA, ANTES DE DETERMINAR OS MÓDULOS DE CISALHAMENTO..... | 99 |
| FIGURA 44 - | G' (A) E G'' (B) EM FUNÇÃO DA FREQUÊNCIA ANGULAR, A TEMPERATURA DE 50°C , PARA A SOLUÇÃO DE XGJ E PARA AS DISPERSÕES DE XGJ COM Na_2SO_4 A $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (VERMELHO), A $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ (VERDE), A $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ (AMARELO), A $0,65 \text{ mol L}^{-1}$ (AZUL), A $0,75 \text{ mol L}^{-1}$ (ROSA), A 1 mol L^{-1} AZUL CLARO)..... | 100 |
| FIGURA 45 - | ÂNIOS DA SÉRIE DE HOFMEISTER ORDENADOS DE ACORDO COM O CARÁTER MAIS CAOTRÓPICO ATÉ O MAIS COSMOTRÓPICO..... | 101 |
| FIGURA 46a - | G' (-□-) E G'' (-○-) COMO FUNÇÃO DO TEMPO PARA A XGJ A 1 % (m/m) COM NaNO_3 A 1 mol L^{-1} EM VELOCIDADE ANGULAR DE $\omega = 1,0 \text{ rad s}^{-1}$. RAMPA DE AQUECIMENTO ATÉ 50°C (-□-) E FASE LAG DE 16 HORAS. | 102 |

| | | |
|--------------|---|-----|
| FIGURA 46b - | MÓDULO DE ARMAZENAMENTO (-■-) E PERDA (-●-) EM DIFERENTES TEMPERATURAS DURANTE O ARREFECIMENTO DE 50 °C A 10 °C E SUBSEQUENTE AQUECIMENTO A 50 °C, EM $\omega = 6,28 \text{ rad s}^{-1}$. PARA A AMOSTRAS DE XGJ COM $C = 10 \text{ mg mL}^{-1}$ E NaNO_3 A 1 mol L^{-1} . A AMOSTRA FOI MANTIDA DURANTE 1,5 h EM CADA TEMPERATURA, ANTES DOS MÓDULOS DE CISALHAMENTO SEREM DETERMINADOS..... | 102 |
| FIGURA 47 - | IONIZAÇÃO DO HIDROGÊNIO DO ÁCIDO FOSFÓRICO E OS pK_a CORRESPONDENTES E AS FAIXAS DE pH EM QUE ELE ATUA COMO TAMPÃO..... | 103 |
| FIGURA 48a - | (A) G' (-■-) E G'' (-□-) COMO FUNÇÃO DO TEMPO PARA A XGJ A $C = 10 \text{ mg mL}^{-1}$ COM NaH_2PO_4 A 1 mol L^{-1} EM VELOCIDADE ANGULAR DE $\omega = 1,0 \text{ rad s}^{-1}$, E $T = 50 \text{ °C}$. O TEMPO DE GELIFICAÇÃO ESTÁ INDICADO NA FIGURA (tg)..... | 104 |
| FIGURA 48b - | MÓDULO DE ARMAZENAMENTO (-●-) E PERDA (·····) A DIFERENTES TEMPERATURAS DURANTE O RESFRIAMENTO DE 50 °C A 10 °C, EM $\omega = 6,28 \text{ rad s}^{-1}$. PARA A AMOSTRAS DE XGJ A $C = 10 \text{ mg mL}^{-1}$ COM NaH_2PO_4 A 1 mol L^{-1} . A AMOSTRA FOI MANTIDA DURANTE 1,5 h EM CADA TEMPERATURA, ANTES DOS MÓDULOS DE CISALHAMENTO SEREM DETERMINADOS..... | 104 |
| FIGURA 49a - | G' (-□-) E G'' (-○-) COMO FUNÇÃO DO TEMPO PARA A XGJ A $C = 10 \text{ mg mL}^{-1}$ COM NaCl A 1 mol L^{-1} EM VELOCIDADE ANGULAR DE $\omega = 1,0 \text{ rad s}^{-1}$. RAMPA DE AQUECIMENTO ATÉ 50 °C (-□-) E FASE LAG DE 16 HORAS..... | 105 |
| FIGURA 49b - | MÓDULO DE ARMAZENAMENTO (-●-) E PERDA (-○-) EM DIFERENTES TEMPERATURAS DURANTE O ARREFECIMENTO DE 50 °C A 10 °C E SUBSEQUENTE AQUECIMENTO A 50 °C, EM $\omega = 6,28 \text{ rad s}^{-1}$. PARA A AMOSTRAS DE XGJ A $C = 10 \text{ mg mL}^{-1}$ COM NaCl A 1 mol L^{-1} . A AMOSTRA FOI MANTIDA DURANTE 1,5 h EM CADA TEMPERATURA, ANTES DOS MÓDULOS DE CISALHAMENTO SEREM DETERMINADOS..... | 105 |
| FIGURA 50a - | G' (-□-) E G'' (-○-) COMO FUNÇÃO DO TEMPO PARA XGJ $C = 10 \text{ mg mL}^{-1}$ COM NaHPO_4 A 1 mol L^{-1} EM VELOCIDADE ANGULAR DE $\omega = 6,28 \text{ rad s}^{-1}$, A 50 °C. O TEMPO DE GELIFICAÇÃO ESTÁ INDICADO NA FIGURA (tg)..... | 106 |
| FIGURA 50b - | MÓDULO DE ARMAZENAMENTO (-●-) E PERDA (-○-) EM DIFERENTES TEMPERATURAS DURANTE O ARREFECIMENTO DE 50 °C A 10 °C E SUBSEQUENTE AQUECIMENTO A 50 °C, EM $\omega = 6,28 \text{ rad s}^{-1}$. PARA A AMOSTRA DE XGJ A $C = 1 \text{ mg mL}^{-1}$ COM NaHPO_4 A 1 mol L^{-1} . A AMOSTRA FOI MANTIDA DURANTE 1,5 h EM CADA TEMPERATURA, ANTES DOS MÓDULOS DE CISALHAMENTO SEREM DETERMINADOS..... | 106 |

| | | |
|-------------|--|-----|
| FIGURA 51 - | G'(A) E G''(B) EM FUNÇÃO DA FREQUÊNCIA ANGULAR, A TEMPERATURA DE 50 °C, PARA AS DISPERSÕES DE XGJ À C = 10 mg mL ⁻¹ COM Na ₂ SO ₄ A 1 mol L ⁻¹ (PRETO), Na ₂ HPO ₄ A 1 mol L ⁻¹ (VERMELHO), NaCl A 1 mol L ⁻¹ (VERDE), NaH ₂ PO ₄ A 1 mol L ⁻¹ (AMARELO), NaNO ₃ A 1 mol L ⁻¹ (AZUL)..... | 107 |
| FIGURA 52 - | IMAGEM DE MICROSCOPIA CONFOCAL POR VARREDURA A LASER DA XGJ A C = 10 mg mL ⁻¹ COM Na ₂ SO ₄ A 1 mol L ⁻¹ , APÓS A PERMANÊNCIA DURANTE 1 HORA A TEMPERATURA DE 50 °C. MAGNIFICAÇÃO DE 60X E ZOOM DE 4X..... | 113 |
| FIGURA 53 - | IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRONICA DE VARREDURA DAS AMOSTRAS DE XGJ A C = 10 mg mL ⁻¹ NATIVA (a) XGJ COM Na ₂ SO ₄ A 0,5 mol L ⁻¹ (b); XGJ COM Na ₂ SO ₄ A 0,75 mol L ⁻¹ (c); E XGJ COM Na ₂ SO ₄ A 1 mol L ⁻¹ (d); MAGNIFICAÇÃO 5kX E HV 15,0 kV..... | 115 |
| FIGURA 54 - | IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRONICA DE VARREDURA DAS AMOSTRAS DE XGJ A C = 10 mg mL ⁻¹ COM Na ₂ SO ₄ A 0,5 mol L ⁻¹ (a); XGJ COM Na ₂ SO ₄ A 0,75 mol L ⁻¹ (b); E XGJ COM Na ₂ SO ₄ A 1 mol L ⁻¹ (c); MAGNIFICAÇÃO 20kx E HV 15,0 kV..... | 116 |
| FIGURA 55 - | IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRONICA DE VARREDURA DAS AMOSTRAS DE XGJ A C = 10 mg mL ⁻¹ COM Na ₂ SO ₄ A 0,75 mol L ⁻¹ (a); E XGJ COM Na ₂ SO ₄ A 1 mol L ⁻¹ (b); MAGNIFICAÇÃO 50kx E HV 15,0 kV..... | 117 |
| FIGURA 56 - | IMAGENS DE EDS PARA A AMOSTRA DE XGJ A C = 10 mg mL ⁻¹ COM Na ₂ SO ₄ A 0,75 mol L ⁻¹ . (a) CORRESPONDE A COMPILAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DAS IMAGENS DOS ELEMENTOS QUÍMICOS SÓDIO (b); ENXOFRE (c); OXIGÊNIO (d) E CARBONO (e)..... | 118 |
| FIGURA 57 - | GRÁFICOS DE AQUECIMENTO ATÉ A TEMPERATURA DE 50 °C, ANTES DAS AMOSTRAS SEREM MANTIDAS DURANTE 16 HORAS A 50 °C, XGJ A C = 10 mg mL ⁻¹ (a) XGJ COM 0,75 mol L ⁻¹ ; (b) XGJ COM 1 mol L ⁻¹ . TAXA DE AQUECIMENTO 0,5 °C min ⁻¹ | 120 |
| FIGURA 58 - | PRIMEIRA RAMPA SUCESSIVAS DE AQUECIMENTO (LINHA CONTINUA PRETA) E RESFRIAMENTO (LINHA CONTINUA AZUL); SEGUNDA RAMPA DE AQUECIMENTO (LINHA TRACEJADA PRETA) E RESFRIAMENTO (LINHA TRACEJADA AZUL) DAS AMOSTRAS XGJ NATIVA* (a); XGJ COM 0,5 mol L ⁻¹ (b); XGJ COM 0,75 mol L ⁻¹ (c)**; XGJ COM 1 mol L ⁻¹ (d). TAXA DE AQUECIMENTO 0,2 °C min ⁻¹ | 122 |
| FIGURA 59 - | ESPECTROS DE DICROÍSMO CIRCULAR DA XGJ A C = 1 mg mL ⁻¹ NATIVA (a); XGJ COM Na ₂ SO ₄ A 0,5 mol L ⁻¹ (b) E Na ₂ SO ₄ A 1 mol L ⁻¹ (c)..... | 124 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|------------|--|-----|
| TABELA 1 - | CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS PARA A QUANTIFICAÇÃO DOS MONOSSACARÍDEOS PRESENTES NA AMOSTRA..... | 64 |
| TABELA 2 - | TEMPO DE RETENÇÃO E VALORES REFERENTES AO COEFICIENTE ANGULAR E LINEAR, OBTIDOS A PARTIR DA CURVA PADRÃO DOS MONOSSACARÍDEOS DE GALACTOSE, XILOSE E GLUCOSE..... | 64 |
| TABELA 3 - | PARÂMETROS MACROMOLECULARES DA XILOGLUCANA DE JATOBÁ NATIVA E HIDROLIZADAS ENZIMÁTICAMENTE COM EG II DURANTES 30 MIN E 20 HORAS..... | 77 |
| TABELA 4 - | IMAGENS DE MICROSCOPIA CONFOCAL POR VARREDURA A LASER DA XGJ NATIVA A C = 10 mg mL ⁻¹ E COM CONCENTRAÇÃO DE Na ₂ SO ₄ DE 0,1 mol L ⁻¹ , 0,5 mol L ⁻¹ , 0,75 mol L ⁻¹ E 1 mol L ⁻¹ , APÓS PERMANECEREM 16 HORAS À TEMPERATURA CONSTANTE DE 50 °C E ARREFECIMENTO A TEMPERATURA DE 40 °C, 30 °C, 20 °C E 5 °C. MAGNIFICAÇÃO DE 60X..... | 110 |
| TABELA 5 - | IMAGENS DE MICROSCOPIA CONFOCAL POR VARREDURA A LASER DA XGJ NATIVA A C = 10 mg mL ⁻¹ E COM Na ₂ SO ₄ A 0,5 mol L ⁻¹ , 0,75 mol L ⁻¹ e 1 mol L ⁻¹ , APÓS PERMANECEREM 16 HORAS À TEMPERATURA CONSTANTE DE 50 °C E POSTERIOR ARREFECIMENTO À TEMPERATURA DE 40 °C, E 20 °C. MAGNIFICAÇÃO DE 60X, ZOOM DE 4X..... | 111 |
| TABELA 6 - | IMAGENS DE MICROSCOPIA CONFOCAL POR VARREDURA A LASER DA XGJ A C = 10 mg mL ⁻¹ COM Na ₂ SO ₄ A 0,5 mol L ⁻¹ , 0,75 mol L ⁻¹ E 1 mol L ⁻¹ . NO TEMPO ZERO A IMAGEM FOI OBTIDA À TEMPERATURA AMBIENTE DE 20 °C E NOS TEMPOS DE 1 HORA, 2,5 HORAS, 3 HORAS, 4 HORAS, 10 HORAS E 24 HORAS APÓS PERMANECEREM À TEMPERATURA CONSTANTE DE 50 °C. MAGNIFICAÇÃO DE 60X..... | 112 |

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

| | |
|------------------|--|
| GA | - Ácido gálico |
| TFA | - Ácido trifluoroacético |
| DTA | - Análise térmica diferencial |
| δ | - Ângulo de fase |
| NaN ₃ | - Azida de sódio |
| DSC | - Calorimetria de varredura diferencial |
| η_M | - Componente viscoso |
| G _M | - Componente elástico |
| SEC | - Cromatografia de exclusão por tamanho |
| γ | - Deformação de cisalhamento |
| γ_e | - Deformação elástica |
| γ_v | - Deformação viscosa |
| CD | - Dicroísmo circular |
| EDS | - Espectroscopia de Energia Dispersiva |
| ΔH | - Entalpia |
| ΔG | - Energia livre |
| ΔS | - Entropia |
| EG II | - Endo-1,4- β -D-glucanase II |
| F | - Flucose |
| Gal | - Galactose |
| Glc | - Glucose |
| EGCg | - Galato de epigallocatequina |
| ECg | - Galato de epicatequina |
| G | - Glucose |
| L | - Galactose |
| LCST | - “ <i>Lower Critical Solution Temperature</i> ” (Temperatura de Solução Crítica Inferior) |
| μ -DSC | - Microcalorimetria de varredura diferencial |
| MEV | - Microscopia eletrônica de varredura |
| M _c | - Massa molar média das seções da cadeia polimérica elasticamente ativa |

| | |
|----------------|---|
| M_w | - Massa molar ponderal média |
| M_n | - Massa molar média numérica |
| G^* | - Módulo complexo |
| G' | - Módulo elástico ou Módulo de armazenamento |
| G'' | - Módulo viscoso ou Módulo de perda |
| G | - Módulo de cisalhamento |
| G_e | - Módulo de elasticidade independente de frequência |
| $NaNO_3$ | - Nitrato de sódio |
| Pa | - Pascal |
| PEO | - Poli(óxido de etileno) |
| RMN | - Ressonância Magnética Nuclear |
| T_g | - Temperatura de Transição vítrea |
| tg | - Tempo de gelificação |
| λ | - Tempo de relaxação |
| σ | - Tensão de cisalhamento |
| $\dot{\gamma}$ | - Taxa de cisalhamento |
| η | - Viscosidade |
| dH | - Variação de entalpia |
| XG | - Xiloglucana |
| XGJ | - Xiloglucana de Jatobá |
| XGT | - Xiloglucana de Tamarindo |
| X | - Xilose |
| β -gal | - β -galactosidase |

LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|----------------|----------------------------------|
| α | - alfa |
| β | - Beta |
| Δ | - Delta |
| \bar{D} | - Dispersão (M_w/M_n) |
| η | - Eta – dispersão |
| $\dot{\gamma}$ | - Gama – taxa de cisalhamento |
| γ | - Gama – deformação |
| λ | - Lambda – comprimento de onda |
| σ | - Sigma – tensão de cisalhamento |
| ω | - Ômega – frequência angular |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 23 |
| 2 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 28 |
| 2.1 | HIDROGÉIS..... | 28 |
| 2.2 | XILOGLUCANA..... | 33 |
| 2.3 | OBTENÇÃO DE HIDROGÉIS TERMO-SENSÍVEIS DE XILOGLUCANA ATRAVÉS DA REAÇÃO ENZIMÁTICA COM β -GALACTOSIDASE..... | 38 |
| 2.4 | OBTENÇÃO DE HIDROGÉIS TERMO-RESPONSIVOS DE XILOGLUCANA ATRAVÉS DA ADIÇÃO DE AGENTES GELIFICANTES..... | 41 |
| 2.5 | OBTENÇÃO DE HIDROGEL TERMO-RESPONSIVO DE XILOGLUCANA ATRAVÉS DA ADIÇÃO DE SAIS COSMOTRÓPICOS..... | 43 |
| 2.5.1 | Série Hofmeister..... | 43 |
| 2.6 | REOLOGIA..... | 47 |
| 2.6.1 | Materiais Viscoelásticos..... | 50 |
| 2.6.2 | Testes dinâmicos oscilatórios..... | 51 |
| 2.7 | ANÁLISES DE MICROCALORIMETRIA DE VARREDURA DIFERENCIAL..... | 53 |
| 2.8 | DICROÍSMO CIRCULAR..... | 56 |
| | CAPÍTULO 1: GELIFICAÇÃO TÉRMICA DA XILOGLUCANA INDUZIDA POR DEGALACTOSILAÇÃO: ASPECTOS CINÉTICOS E ESTRUTURAIS..... | 59 |
| 3 | OBJETIVO | 60 |
| 3.1 | OBJETIVO GERAL..... | 60 |
| 3.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 60 |
| 4 | MATERIAIS E MÉTODOS..... | 61 |
| 4.1 | MATERIAL..... | 61 |
| 4.2 | PURIFICAÇÃO DA XILOGLUCANA..... | 61 |
| 4.3 | HIDRÓLISE ENZIMÁTICA COM ENDOGLUCANASE II..... | 61 |
| 4.4 | ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO POR TAMANHO.. | 62 |
| 4.5 | DEGALACTOSILAÇÃO ENZIMÁTICA DA XILOGLUCANA..... | 62 |
| 4.6 | DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DE GALACTOSE..... | 63 |
| 4.7 | MEDIDAS RELÓGICAS..... | 65 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 66 |
| 5.1 | GELIFICAÇÃO DA XILOGLUCANA DURANTE A DEGALACTOSILAÇÃO..... | 66 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 5.2 | DEPENDÊNCIA DE TEMPERATURA DO MÓDULO DE ELASTICIDADE..... | 72 |
| 5.3 | ESTRESSE E RECUPERAÇÃO DO RENDIMENTO..... | 75 |
| 5.4 | EFEITO DA MASSA MOLAR SOBRE A GELIFICAÇÃO TERMO-REVERSÍVEL..... | 77 |
| 5.4.1 | Análises dinâmicas oscilatórias..... | 78 |
| 6 | CONCLUSÃO..... | 83 |
| | CAPÍTULO 2: GELIFICAÇÃO TÉRMICA DA XILOGLUCANA INDUZIDA POR ADIÇÃO DE SAIS COSMOTRÓPICOS: ASPECTOS CINÉTICOS E ESTRUTURAIS..... | 84 |
| 3 | OBJETIVO..... | 85 |
| 3.1 | OBJETIVO GERAL..... | 85 |
| 3.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 85 |
| 4 | MATERIAIS E MÉTODOS..... | 86 |
| 4.1 | MATERIAL..... | 86 |
| 4.2 | PURIFICAÇÃO DA XILOGLUCANA..... | 86 |
| 4.3 | PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE XILOGLUCANA COM SULFATO DE SÓDIO..... | 86 |
| 4.4 | PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE XILOGLUCANA COM OUTROS SAIS COSMOTRÓPICOS..... | 87 |
| 4.5 | ANÁLISES REOLÓGICAS..... | 87 |
| 4.6 | ANÁLISE DE MICROSCOPIA CONFOCAL DE VARREDURA A LASER.... | 88 |
| 4.7 | MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA..... | 88 |
| 4.8 | ESPECTROSCOPIA DE ENERGIA DISPERSIVA..... | 89 |
| 4.9 | MEDIÇÕES DE MICROCALORIMETRIA DE VARREDURA DIFERENCIAL..... | 89 |
| 4.10 | DICROÍSMO CIRCULAR..... | 89 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 90 |
| 5.1 | EFEITO DO SULFATO DE SÓDIO NA GELIFICAÇÃO DA XILOGLUCANA..... | 90 |
| 5.2 | AVALIAÇÃO DE POSSÍVEL GELIFICAÇÃO COM OUTROS SAIS..... | 101 |
| 5.3 | ANÁLISE DE MICROSCOPIA CONFOCAL POR VARREDURA A LASER. | 108 |
| 5.4 | MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA..... | 114 |
| 5.4.1 | Espectroscopia de Energia Dispersiva..... | 117 |
| 5.5 | MEDIÇÕES DE MICROCALORIMETRIA DE VARREDURA DIFERENCIAL..... | 119 |
| 5.6 | DICROISMO CIRCULAR..... | 123 |
| 6 | CONCLUSÃO..... | 125 |
| | REFERÊNCIAS..... | 127 |

1 INTRODUÇÃO

A xiloglucana (XG) é um polissacarídeo formado por unidades de β -D-glucopiranosose (Glc) com ligação 1 \rightarrow 4. Algumas unidades de glucose são substituídas em O-6 por α -D-xilopiranosose (Xil) e alguns monossacarídeos de xilose são substituídos em O-2 por β -D-galactopiranosose (Gal) (CARPITA; MCCANN, 2000; HAYASHI; OGAWA; MITSUISHI, 1994).

A XG é mais comumente extraída das sementes de *Tamarindo indica* (XGT), mas as sementes de *Hymenaea courbaril* (XGJ) podem ser uma fonte alternativa deste polissacarídeo. A estrutura química e as propriedades da XG extraída das sementes de *H. courbaril* já foram extensivamente descritas em literatura (FREITAS et al., 2015; FREITAS et al., 2005; SANTOS et al., 2004; BUCKERIDGE et al., 1997; LIMA et al., 1995; LIMA et al., 1993). Entretanto, ainda existem muitos pontos que podem ser explorados principalmente com relação as aplicações biotecnológicas.

Tem-se relatado que géis termo-reversíveis de XG de diferentes fontes podem ser formados quando uma fração das cadeias internas de Gal é seletivamente removida por tratamento enzimático com β -galactosidase (β -gal) (BRUN-GRAEPPi et al., 2010; NISBET et al., 2006; SIRAKAWA; YAMATOYA; NISHINARI, 1998).

A remoção de Gal permite que haja interações hidrofóbicas entre os segmentos da cadeia de XG, o que promove a reticulação entre as cadeias em temperaturas elevadas, resultando na formação do gel. Os géis de XG obtidos após a degalactosilação são interessantes em diversas aplicações, contudo o uso na área biomédica tem sido mais explorado, devido ao fato desses hidrogéis serem biocompatíveis e termo-reversíveis (BURGALASSI et al., 2009; COVIELLO et al., 2007; KAWASAKI et al., 1999; MIYAZAKI et al., 1998).

Estudos reológicos aprofundados sobre o processo de gelificação são importantes para uma melhor compreensão do comportamento do gel e correta aplicação deste. Em literatura, estudos da formação do gel a partir da XG degalactosilada ainda são escassos, entretanto, uma investigação mais detalhada desse tipo foi relatada por Brun-Graeppi e colaboradores (2010). Eles realizaram ensaios reológicos para descobrir qual a temperatura necessária para que ocorra a gelificação e qual a quantidade de galactose que precisa ser removida para que ela se inicie. Constatou-se que se 30% ou mais das cadeias laterais de Gal forem removidas, os géis são formados durante uma rampa de aquecimento até 60 °C à

concentração de XG de tamarindo de 2% (m/m). Um aumento lento do módulo de elasticidade foi observado quando a temperatura foi mantida a 60 °C. Verificou-se ainda que a temperatura crítica do gel, a qual corresponde a temperatura em que ocorre a gelificação, diminuía se mais cadeias laterais de Gal fossem removidas.

Miyazaki e colaboradores (1998) observaram, através de análises reológicas, a influência da concentração sobre a formação do gel. Eles relataram que um pequeno decréscimo da temperatura do gel foi observado quando a concentração de polímero foi aumentada de 1,5% (m/m) para 2,5% (m/m), indicando que a concentração de polímero utilizada influencia na formação do gel. Durante a rampa de resfriamento foi observada a transição da fase gel para sol, entretanto a uma temperatura abaixo da qual ocorreu a gelificação. Busato e colaboradores (2009) verificaram que, através de testes reológicos e nas concentrações de 1,5 e 2,5% (m/m), após a remoção de 50% de Gal nas cadeias laterais, soluções aquosas de XGJ formaram géis fortes à temperatura acima de 24 °C.

O comportamento reológico da XG nativa oriunda das sementes de *H. courbaril* foi investigada em detalhe por Freitas e colaboradores (2015). Os ensaios reológicos tiveram como objetivo estudar as redes gelificadas formadas. Verificou-se que uma rede transitória densamente reticulada foi formada acima da concentração crítica de XGJ, estas eram formadas por ligações cruzadas devido as ligações de hidrogênio com tempos de vida relativamente curtos. Além disso, um segundo tipo de ligações cruzadas foi identificado com tempo de vida muito longo, levando a formação de um gel fraco quasi-permanente. A formação deste último tipo de ligações cruzadas foi favorecida pelo aquecimento e foi atribuída às interações hidrofóbicas entre as seções da cadeia XGJ desprovidas de cadeias laterais de Gal. A XGJ nativa contém poucas dessas regiões, o que explica por que a densidade dessas reticulações quasi-permanentes era muito baixa.

Freitas e colaboradores (2011) estudaram a cinética da degalactosilação enzimática da XGJ e o processo de agregação resultante em soluções diluídas. A partir de dados obtidos pelo monitoramento da reação de degalactosilação em tempo real utilizando espalhamento de luz laser, viscosímetro e cromatografia de exclusão por tamanho, concluíram que a agregação é o principal fenômeno responsável pela gelificação da xiloglucana degalactosilada. Os autores observaram também a formação de microgéis devido ao aumento na formação de agregados em tempos maiores de reação, em sistemas diluídos.

As características supracitadas da XG seriam ainda mais interessantes, se, sob certas condições, a XG pudesse formar géis *in situ*, gerados a partir da injeção de um fluido no local do corpo desejável antes da gelificação, para que a aplicação do produto seja realizada de uma forma minimamente invasiva (RUEL-GARIÉPY; LEROUX, 2004). Esta transição sol-gel pode ser reversível ou irreversível e ocorrerem em resposta a uma mudança na temperatura, pH, força iônica ou de composição (HOFFMAN, 2002; BEEL; PEPPAS, 1996).

Hidrogéis de XG com a característica de serem termo-responsivos, além de serem obtidos a partir da reação enzimática de β -degalactosilação (BRUN-GRAEPPi et al., 2010; NISBET et al., 2006 SIRAKAWA, YAMATOYA E NISHINARI, 1998) podem ser formados através da adição de Eritocromo Negro T (HIRUN; TANTISHAIYAKUL; PICHAYAKORN, 2010), álcoois (YUGUCHI et al., 2004), epigallocatequina (NITTA et al., 2004), ácido gálico (HIRUN et al., 2016), e vermelho congo (YUGUCHI; HIROTSU; HOSOKAWA, 2005b).

O limiar entre a transição sol-gel de hidrogéis termo-responsivos em resposta a uma mudança de temperatura é definido como a menor temperatura de solução crítica ("*Lower Critical Solution Temperature*" - LCST). A mudança na solubilidade polimérica, que leva a formação do gel ou ao estado sol, em resposta à variação da temperatura é devido a mudança no equilíbrio entre a porção hidrofóbica e hidrofílica presentes ao longo da cadeia do polissacarídeo e a variação de energia livre. Em temperaturas abaixo da LCST, as cadeias poliméricas preferem interagir com a água, tornando o polímero solúvel. Acima da LCST, as ligações de hidrogênio entre a água e o polímero tornam-se desfavoráveis em comparação com as interações polímero-polímero e água-água. Devido a isto, ocorre uma transição quando a molécula solvatada se desidrata, gerando, conformacionalmente, a contração da cadeia e tornando a estrutura mais hidrofóbica, e consequentemente levando à formação do gel (TAYLOR; CERANKOWSKI, 1975; KIM et al., 2011).

Para promover uma maior interação entre as cadeias poliméricas e obter hidrogéis responsivos, os autores Pațachia-Florea, Friedrich e Thomann (2009) estudaram o efeito da adição de sais cosmotrópicos e caotrópicos (Na_2SO_4 , NaCl e NaNO_3) em poli(álcool vinílico). Eles observaram um aumento no módulo de armazenamento G' quando adicionaram o sal cosmotrópico (Na_2SO_4), evidenciando uma maior densidade de reticulação devido ao aumento das interações entre polímero-polímero como consequência do fenômeno de "*salting-out*".

Almeida, Rakesh e Zhao (2014) realizaram dois estudos utilizando um polímero neutro para a obtenção de um hidrogel a partir da adição de sais. No primeiro estudo eles adicionaram NaCl ou CaCl₂ a solução de Hidroxipropilcellulose (HPMC) e avaliaram as propriedades viscoelásticas do gel formado com o aumento e a diminuição da temperatura. Aumentando-se a concentração de sal adicionado houve uma diminuição na temperatura de gelificação e aumento do módulo elástico. Neste estudo não foi observado uma diferença significativa de comportamento dos géis devido a variação do cátion (ALMEIDA; RAKESH; ZHAO, 2014a). Num estudo posterior, eles acrescentaram NaCl, KCl ou CaCl₂ às soluções de HPMC, e verificaram que a temperatura de gelificação diminuiu linearmente em função da concentração, independentemente do sal adicionado. (ALMEIDA; RAKESH; ZHAO, 2014b).

Hidrogéis formados através da adição de sais também foram obtidos utilizando outros polissacarídeos neutros como a konja glucomannan (Yin et. al, 2008) e curdlan (Funami; Nishinari, 2007). Curley e colaboradores (2014) obtiveram um hidrogel termicamente estável e resistente à quebra pela adição de sulfato de sódio à solução aquosa de poli(álcool vinílico), o qual pode ser utilizado como material potencial para o implante de menisco artificial.

Com base no que foi exposto, o presente trabalho tem como objetivo inicial, que será apresentado no **capítulo 1**, estudar mais detalhadamente o efeito da degalactosilação da XG oriunda das sementes de *H. courbaril* nas propriedades mecânicas dinâmicas de soluções aquosas de XGJ em função da concentração de XGJ. Investigou-se a cinética da gelificação durante a degalactosilação, medindo *in-situ* os módulos de cisalhamento em função do tempo após a adição de diferentes quantidades de β -gal. A dependência da temperatura do módulo de elasticidade foi determinada para estudar a reversibilidade térmica. Cadeias de XGJ com diferentes massas molares médias ponderadas (M_w) foram utilizadas para estudar o efeito desta mudança na gelificação.

Posteriormente, foi desenvolvido um trabalho, exposto no **capítulo 2**, com o objetivo de buscar a formação de hidrogéis termo-sensíveis utilizando a XGJ e empregando uma metodologia ainda não explorada. Nosso foco foi a obtenção desses hidrogéis através da adição de um ânion cosmotrópico, íon sulfato, e comparou-se o gel formado com outros obtidos através da adição de outros ânions elencados na série de Hofmeister. Avaliou-se a formação do hidrogel termo-sensível à temperatura através de testes dinâmicos oscilatórios ao longo do tempo e em várias temperaturas.

Adicionalmente, foram realizados experimentos de gelificação por microscopia confocal a laser e eletrônica de varredura. Apresenta-se também as avaliações calorimétricas obtidas através das análises com o microcalorímetro diferencial de varredura e da conformação da XGJ ao longo da temperatura com ou sem adição de ânions e através da técnica de dicroísmo circular.

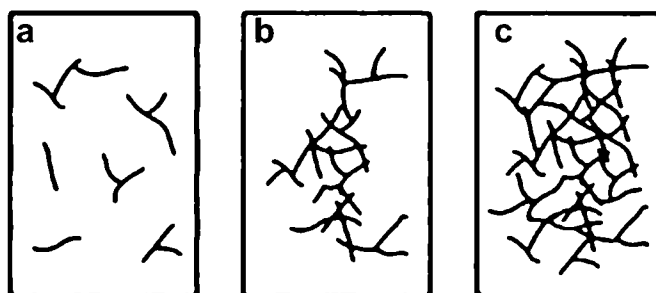
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 HIDROGÉIS

Hidrogéis são materiais viscoelásticos formados por uma rede tridimensional (3D) com a habilidade de absorver uma grande quantidade de água e mantê-la nesta estrutura, sem que haja o rompimento da rede 3D. A estrutura tridimensional desses géis pode ser formada por ligações químicas ou interações físicas (PEPPAS; MIKOS, 1986; PATEL; MEQUANINT, 2011).

Uma solução polimérica dispersa em um solvente, na qual as moléculas estão solúveis, é conhecida como estando no estado Sol (FIGURA 1a). Neste estado não há a presença de pontos significativos de reticulação. Entretanto, quando se começa a aumentar a quantidade de pontos de reticulação entre as cadeias poliméricas (FIGURA 1b), em certo momento este polímero não estará mais dissolvido no solvente, mas apresentará um inchamento limitado neste (FIGURA 1c). Isto ocorre porque a solubilidade é contrabalanceada pela força de elasticidade gerada por esses pontos de reticulação. A este estado, chamado de gel, ocorre a formação da rede 3D ou gelificada. A transição que acontece entre um sistema em que as moléculas estão solúveis e não há pontos de reticulação no meio delas para um sistema em que há inúmeros pontos de reticulação é chamado de transição sol-gel (RUBINSTEIN; COLBY, 1992; PEPPAS et al., 2000).

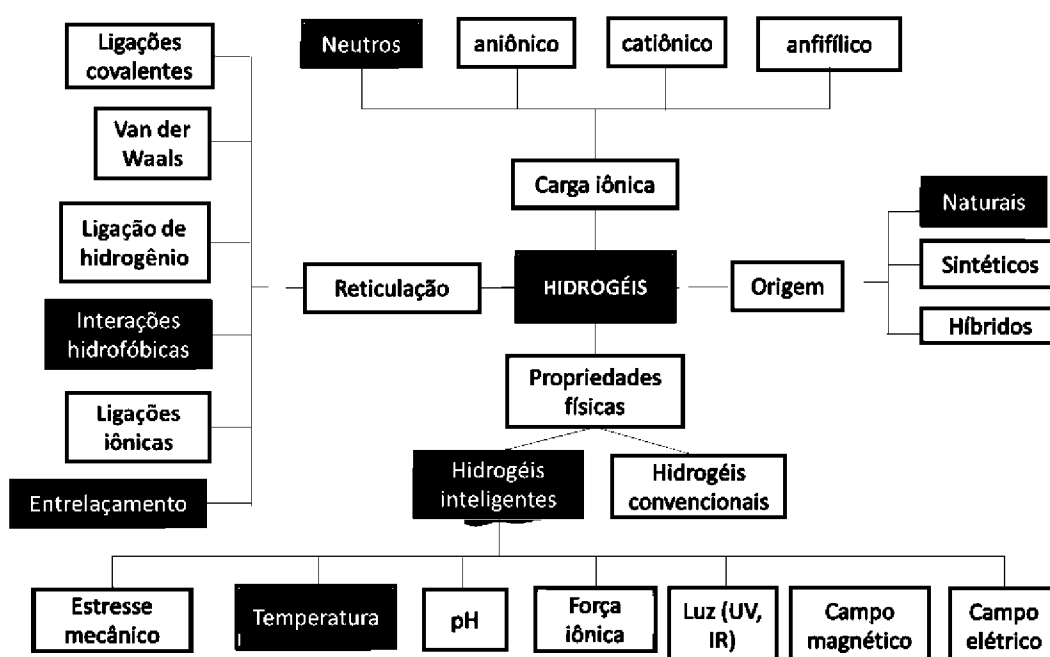
FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA TRANSIÇÃO DO ESTADO SOL (a) –GEL (c).



FONTE: Adaptado de Kakihana, 1996.

Os hidrogéis podem ser classificados de acordo com a carga iônica, origem, natureza do inchaço ou da reticulação e das propriedades físicas, como mostrado na FIGURA 2. Entretanto, dentre essas características a mais importante é a natureza da reticulação (PATEL; MEQUANINT, 2011). Hidrogéis formados por reticulação química possuem limitações em sua utilização devido ao fato de, usualmente, serem utilizados agentes tóxicos e pela dificuldade em se remover completamente os resíduos destes. A reticulação física é formada por interações entre as cadeias poliméricas que podem ocorrer devido às ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, entrelaçamento, ligações iônicas, interações de van der Waals (BAE et al., 2000; QIU; WIRSEN; ALBERTSSON, 2000; PARK; BAE, 2002; PATEL; MEQUANINT, 2011).

FIGURA 2 – ESQUEMA DA CLASSIFICAÇÃO DOS HIDROGÉIS.



FONTE: Adaptado de Patel e Mequanint, 2011.

Hidrogéis chamados de “inteligentes” são caracterizados como sendo géis que são formados em resposta a algum estímulo do ambiente. A capacidade de inchamento desses géis, ou seja, a formação dos pontos de reticulação ocorre devido aos parâmetros como a temperatura, tipo do sal ou força iônica. A mudança desses parâmetros pode aumentar ou diminuir os pontos de reticulação e a capacidade de intumescimento desses materiais (DEVINE; HIGGINBOTHAM, 2003). Como exemplo

de um hidrogel “inteligente” tem-se o desenvolvido por Barbucci, Magnani e Consumi (2000) que sintetizaram a carboximetilcelulose (CMC) para a obtenção de hidrogéis responsivos à variação do pH. Os géis foram obtidos através da adição de iodeto de clorometilpiridina (CMPJ) à forma ácida da CMC para gerar a formação de hidrogéis com 2,5%, 25%, 50% e 100% de reticulação, o grau de reticulação foi estimado de acordo com a quantidade de CMPJ adicionada. A absorção de água desses hidrogéis formados foi governada pelas ligações de hidrogênio e dependentes do pH, com exceção da amostra com 100% de reticulação.

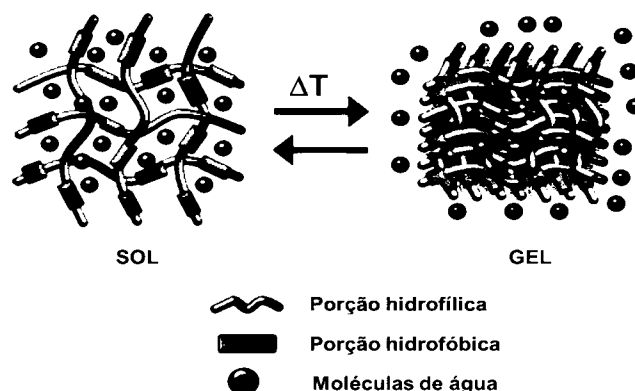
Hidrogéis “inteligentes” termo-sensíveis são formados devido a resposta à mudança de temperatura. Existem vários mecanismos envolvidos nesta gelificação térmica em soluções aquosas, e para alguns polímeros eles ainda são um tema de debate (KLOUDA; MIKOS, 2008). Muitos polímeros exibem uma mudança na solubilidade devido ao aumento da temperatura (“lower critical solution temperature” - LCST). Isto ocorre em virtude das mudanças na hidrofiliicidade e hidrofobicidade na cadeia polimérica, assim como na variação de energia livre (TAYLOR, 1975; SCHILD, 1992 apud in RUEL-GARIÉPY; LEROUX, 2004).

Quando um polímero é disperso em água, existem três tipos de interação que podem ocorrer: entre as moléculas do polímero, as moléculas do polímero e a água, e entre as moléculas de água. Para polímeros que exibem uma LCST, o aumento da temperatura resulta em uma associação desfavorável entre água-polímero, facilitando a interação água-água e polímero-polímero (FIGURA 3). Este tipo de interação gera uma variação de energia livre negativa (ΔG) que favorece a interação entre as cadeias poliméricas. Isto ocorre porque a energia livre varia com a entalpia (ΔH), entropia (ΔS) e a temperatura (T) ($\Delta G = \Delta H - T\Delta S$). O aumento da temperatura resulta em um valor maior do produto $-T\Delta S$ e um ΔG negativo, levando a separação de fases em interações moleculares dependentes da temperatura, principalmente associadas à redução das ligações de hidrogênio e maximização dos efeitos hidrofóbicos. O aumento da entropia translacional do solvente envolvido nas interações dos sítios hidrofóbicos também é um parâmetro decisivo e que rege o sistema, e este fenômeno é conhecido como efeito hidrofóbico (SCHILD, 1992 apud in RUEL-GARIÉPY; LEROUX, 2004).

Existem várias mudanças conformacionais que podem ocorrer na temperatura crítica e todos estes derivam de uma interação física reversível das cadeias de

polímero. Portanto, os géis podem voltar ao estado sol, após o estímulo térmico, que gerou a gelificação, ser removido (KLOUDA; MIKOS, 2008).

FIGURA 3 – TRANSIÇÃO SOL-GEL EM RESPOSTA À MUDANÇA DE TEMPERATURA.

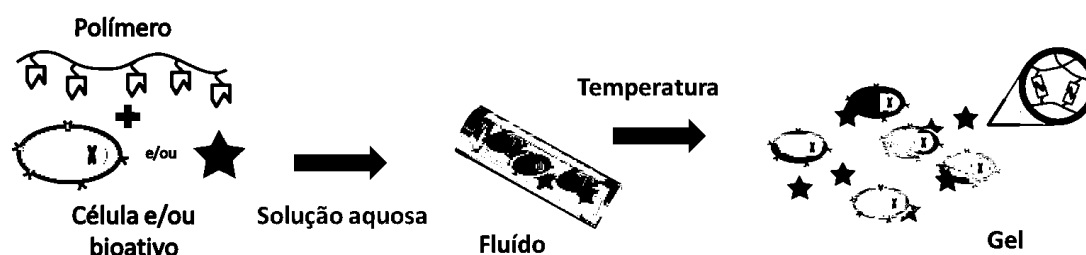


FONTE: Kim e colaboradores, 2011.

A resposta à formação do hidrogel devido ao aumento da temperatura, tornou-se o objetivo de interesse de diversos estudos científicos, devido as suas inúmeras possibilidades de aplicação na indústria biomédica, como em sistemas de entrega de drogas (HE et al., 2008), biosensores (SCHMALJOHANN et al., 2003;), na engenharia de tecidos (RATNER; HOFFMAN, 1976), para terapia gênica de células (PETRINI et al., 2003), no encapsulamento celular e de enzimas (AEBISCHER et al., 1991; EMERICH et al., 1992; ZIELINSHI; AEBISCHER, 1996).

Como material injetável (FIGURA 4), a aplicação de hidrogéis termo-responsivo torna-se interessante por ser um procedimento minimamente invasivo, o qual consiste em injetar um fluido formador de gel no corpo antes da gelificação, de modo que esta ocorra no lugar desejável (RUEL-GARIÉPY; LEROUX, 2004).

FIGURA 4 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DE UM HIDROGEL TERMO-RESPONSIVO INJETÁVEL.



FONTE: <http://www.supramolecularbiomaterials.com/research/>

Dentre os materiais utilizados para a obtenção de hidrogéis termo-responsivos existem os obtidos através de polímeros sintéticos como o copolímero de óxido de etileno e óxido de propileno (poloxâmero 407), utilizado por Bochot e colaboradores (1998). Neste trabalho eles desenvolveram um sistema ocular de liberação controlada de fármacos utilizando lipossomas peguילים dispersos em um hidrogel termo-responsível de poloxâmero 407.

Outra classe de polímeros sintéticos muito utilizada para a formação de hidrogéis termo-responsivos são os Pluronic® (poloxameros, polímeros tribloco de poli(óxido de etileno); poli(propileno) e poli(óxido de etileno)). Os trabalhos de Chen (2011a) e Chen (2011b) estudaram a adição de nanopartículas de prata em hidrogéis formados com Pluronic F127 e F68 para a obtenção de um gel antimicrobiano. Estes foram eficazes no combate ao *Staphylococcus aureus* e tiveram uma eficácia moderada contra a *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Com relação aos biopolímeros, muitos podem ser utilizados para a formação de hidrogéis. Destaca-se a quitosana cuja variação do pH pode levar a formação de um hidrogel (GANGULY; DASH, 2004). Com este material também podem-se obter hidrogéis termo-responsivos através da adição de sais ou poliíons (CHENITE et al., 2000; CHO et al., 2005). Ruel-Gariépy e colaboradores (2000) investigaram as propriedades físicas da quitosana-glicerofosfatada (GP) cuja gelificação ocorreu à temperatura de 37 °C. Segundo os autores a gelificação, além de ser dependente da temperatura também é dependente do grau de desacetilação da quitosana.

Gordon e colaboradores (2010), desenvolveram um sistema de vacina baseado na incorporação de nanopartículas de sílica contendo um antígeno

incorporado numa matriz de hidrogel de quitosana. Esse sistema foi capaz de estimular a proliferação das células imunológicas.

A obtenção de hidrogéis termo-sensíveis também pode ser realizada através da combinação entre polímeros com capacidade de responder à mudança de temperatura e iônica, como é o caso do estudo realizado por Itoh e colaboradores (2008). Neste artigo eles obtiveram um gel através da mistura de pectina, cuja gelificação ocorre em resposta a mudança na força iônica, e a XG parcialmente degalactosilada com a enzima β -galactosidase (β -gal) que possui a característica de ser termo-responsivo. A interação sinérgica entre esses dois polímeros com características diferentes de resposta a mudança do ambiente resultou na formação de um possível veículo de entrega de fármaco via oral com liberação controlada.

Shirakawa, Yamatoya e Nishinari (1998) estudaram a gelificação da XG proveniente de sementes de tamarindo utilizando a enzima fúngica β -gal para remover os resíduos de galactose. Neste trabalho, eles observaram que a gelificação ocorre quando mais de 35% da galactose é removida, tornando o material termo-responsivo e termo-reversível. Reid, Edwards e Dea (1988) observaram a gelificação após a remoção de mais de 50% em XG proveniente de sementes de nastúrio. A gelificação foi atribuída às associações hidrofóbicas entre as cadeias principais sem a presença do monossacarídeo de galactose.

Como mostrado, dentre os polissacarídeos utilizados para a obtenção de hidrogéis termo-responsivos a XG é uma fonte em potencial para o desenvolvimento desses materiais. A técnica mais utilizada para a obtenção do hidrogel termo-responsivo é através da reação de degalactosilação da XG, usando como catalizador a enzima β -gal, entretanto ainda existem muitos aspectos reacionais que devem ser elucidados. A obtenção de um hidrogel através de mecanismos mais baratos e simples também é um outro ponto a ser explorado. Portanto esses aspectos serão o tema dos estudos apresentados as seguir.

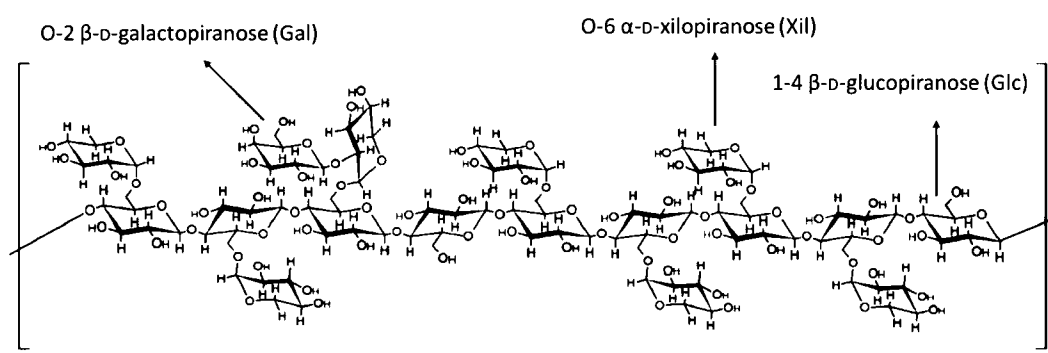
2.2 XILOGLUCANA

A XG é um polissacarídeo ramificado presente na parede celular dos vegetais superiores (ALBERSHEIM et al., 1996). São muito importantes, pois desempenham papel estrutural na parede celular primária desses vegetais, bem como apresentam

função de reserva em sementes de algumas espécies de dicotiledôneas (HAYASHI, 1989).

A estrutura da cadeia principal da xiloglucana é constituída por unidades repetidas de β -D-glucopirranose unidas por ligações glicosídicas do tipo (1 \rightarrow 4). Ocorrem substituições em O-6 por unidades de α -D-xilopirranose, que pode também ser substituída em O-2 por β -D-galactopirranose (CARPITA; MCCANN, 2000; HAYASHI et al., 1994). Além disso, nas XG presentes na parede celular primária, as β -D-galactopirranoses podem ser substituídas em O-2 por α -L-fucopirranoses. Dessa forma, elas são chamadas de XG fucosiladas (CARPITA; GIBEAUT, 1993). A FIGURA 5 mostra a representação esquemática da estrutura da cadeia de XG de semente de Jatobá. A proporção monossacarídica de Glc:Xil:Gal presente na cadeia de XG é de aproximadamente 4:3:1 (HAYASHI, 1989)

FIGURA 5 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA CADEIA DA XILOGLUCANA PROVENIENTE DO ENDOSPERMA DAS SEMENTES DE JATOBÁ.



FONTE: Adaptado de Hayashi, 1989 e Reid, 1985.

Uma vantagem dos polissacarídeos de reserva em sementes, comparados aos de parede celular, é a sua facilidade de extração. Os de reserva são encontrados em grande quantidade, e são obtidos por extração aquosa e praticamente livres de contaminantes, com alto rendimento, formando soluções viscosas em baixas concentrações (HAYASHI et al., 1994). Por tais motivos foram escolhidos para o desenvolvimento deste trabalho.

Dentre as diferentes fontes de XG, as obtidas das sementes de *Hymenaea courbaril* conhecidas como Jatobá (XGJ) são encontradas de forma abundante no Brasil, FIGURA 6 (LIMA et al., 1993). A árvore de Jatobá possui uma copa enorme, crescendo a 30 m de altura, nativa da floresta amazônica e partes da América Central tropical. O gênero *Hymenaea* compreende duas dezenas de espécies de árvores altas distribuídos em zonas tropicais da América do Sul, México e Cuba. Pertence à Família: Fabaceae, Género: *Hymenaea*, Espécie: *courbaril*, Sinônimos: *Hymenaea animifera*, *H. candolleana*, *H. multiflora*, *H. resinifera*, *H. retusa*, *H. stilbocarpa*, *Megacarpa inga* (TAYLOR, 2002).

FIGURA 6 – FOTO DOS FRUTOS E DA POLPA DE JATOBÁ.



FONTE: <https://www.greenme.com.br/remedios-caseiros/4519-jatoba-arvore-nativa-medicinal-uso-da-casca-e-das-sementes>

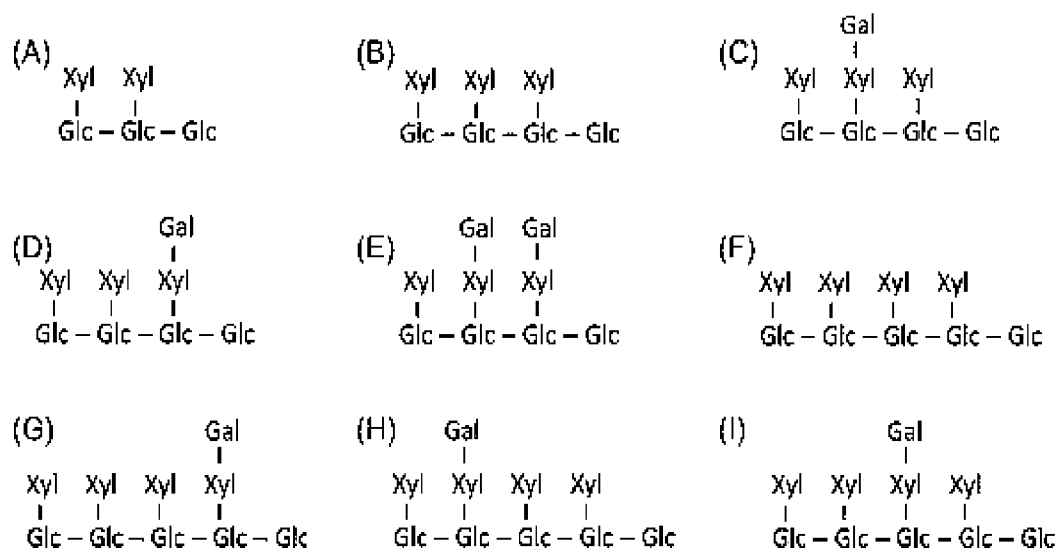
A XG proveniente das sementes de Jatobá é uma fonte opcional e alternativa de XG, a qual possui estrutura similar à comercialmente utilizada (LIMA et al., 1995). Em água, a XGJ forma uma solução viscosa que pode ser utilizada em diversas aplicações, na indústria alimentícia (PONGSAWATMANIT et al., 2006), ou através de modificações ela pode ser aplicada na indústria farmacêutica (KAWASAKI et al., 1999; MAHAJAN et al., 2012; MIYAZAKI et al., 1998) e no desenvolvimento de implantes médicos (NISBET et al., 2010).

A hidrólise enzimática com a endoglucanase II (EGII), também conhecida como celulase, realiza a quebra da cadeia principal de (1→4)-β-D-glucopiranosose. Esta reação reduz a cadeia de XG a blocos menores até a obtenção de oligossacarídeos, os quais ajudam na compreensão da constituição da estrutura do polissacarídeo (HAYASHI, 1989).

Fry e colaboradores (1993) desenvolveram uma nomenclatura para os oligossacarídeos provenientes da XG. Quando a glucose não apresenta nenhuma substituição esta é representada pela letra G, a glucose com substituição por xilose é representada pela letra X, a xilose com substituição por galactose é representada pela letra L, e caso a galactose possua substituição por fucose esta é representada pela letra F.

LIMA e colaboradores (1995) realizaram estudos da estrutura da XG presente nas sementes de Jatobá. Através das análises da composição monossacarídica e dos oligossacarídeos eles concluíram que a XGJ possui uma composição semelhante às outras XG provenientes de diversas fontes. Buckeridge e colaboradores (1997) também realizaram estudos sobre a estrutura e composição oligossacarídica da XG proveniente da *Hymenaea courbaril* comparando-a com a XG de outras origens, *Tamarindus indica* e a *Copaifera langsdorffii*. Nesse estudo minucioso descobriu-se que a XG de *Hymenaea courbaril* possui um oligossacarídeo diferente das demais, o XXXXG (FIGURA 7F).

FIGURA 7 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS ESTRUTURAS DOS OLIGOSSACARÍDEOS PRESENTES NA XILOGLUCANA DE JATOBÁ. (A) XXG, (B) XXXG, (C) XLXG, (D) XXLG, (E) XLLG, (F) XXXXG, (G) XXXLG, (H) XLXXG e (I) XXLXG*



* G é a glucose não-substituída, X é Glucose substituída por xilose e L é a xilose substituída por galactose

FONTE: Spier e colaboradores, 2015.

Segundo os autores supracitados a presença deste oligossacarídeo provavelmente é o responsável pela XG proveniente de Jatobá ter uma conformação diferente das outras utilizadas no trabalho, e devido a este fato, a XGJ tem uma menor interação com o iodo. Freitas et al. (2005) confirmou a presença da nova série de oligossacarídeos, inclusive galactosilados (FIGURA 7G, H, I), e observou um aumento em parâmetros associados à rigidez da cadeia deste polissacarídeo em solução, quando comparado às outras fontes de XG.

Spier e colaboradores (2015) realizaram o primeiro monitoramento em tempo real da hidrólise enzimática com Endo-1,4- β -D-glucanase II (EGII) da XG proveniente das sementes de *Tamarindus indica* e *Hymenaea courbaril*. As análises foram monitoradas utilizando um sistema cromatográfico e através de um reator acoplado ao equipamento de espalhamento de luz estático e viscosimétrico, os dados obtidos ajudaram na compreensão de como esses oligômeros são formados. Foi observada a influência da ação da enzima na formação de dímeros resistentes, devido à presença de galactose vicinal ao sítio de ação da EGII. A ação da enzima EGII é limitada na presença de galactose nas cadeias laterais que impedem a enzima de interagir com o seu sítio ativo (LYND; WYMAN; GERNGROSS, 1999; VINCKEN; BELDMAN; VORAGEN, 1997)

A presença de agregados moleculares em solução de XGJ pode ser minimizada pelo aquecimento das soluções a 85 °C por 2 h, com redução da massa molar, viscosidade intrínseca e raio de giro devido à processos de desagregação (FREITAS *et al.*, 2005). Novamente, estes autores identificaram que a presença de uma série única de oligossacarídeos na estrutura da XGJ, o que induzia a formação de uma molécula mais rígida quando comparada com a de XG de tamarindo.

Arruda e colaboradores (2015) extraíram XGJ e avaliaram a estrutura do polissacarídeo, que apresentou composição de Glc, Xyl e Gal nas proporções de 4:3:2 respectivamente. As análises reológicas mostraram comportamento de soluções viscoelásticas da XGJ em concentrações de 0,5 e 1,0% (m/v). Filmes de XGJ mostraram que ela não apresenta atividade antimicrobiana e hemolítica, além de não apresentar toxicidade, com potencial para aplicações biotecnológicas por ser biocompatível.

Freitas e colaboradores (2015) observaram a formação de duas redes poliméricas em soluções de XGJ: a rede transiente, observada em altas frequências por reologia, com tempo de relaxamento muito baixo (observada a altas frequências

e associadas à ligações físicas e transientes) e geradas por ligações de hidrogênio e pelo entrelaçamento molecular físico, e uma rede quase-permanente (observadas a baixas frequências e associadas a ligações permanentes ou com indicação de serem permanentes ou quase-permanentes), observada a baixos valores de frequência e com tempo de relaxamento elevado, associadas às interações hidrofóbicas de partes da molécula naturalmente livres de galactose. Ambos os tipos de redes (quase-permanente e transiente) na XGJ foram encontradas em concentrações semidiluídas, acima da concentração crítica (c^*).

Apesar dessas interações hidrofóbicas estarem presentes na solução de XGJ, elas não são suficientes a ponto de formarem uma rede gelificada (Freitas et al., 2015). Para que haja a formação de uma rede 3D são necessárias modificações enzimáticas na cadeia polimérica ou através da adição de agentes que promovam a gelificação da XGJ. Essas modificações podem contribuir para melhorar propriedades macromoleculares e hidrodinâmicas, ampliando a gama de aplicação destes polissacarídeos e despertando interesse na exploração dessa matéria-prima de origem biológica em processos industriais e biotecnológicos.

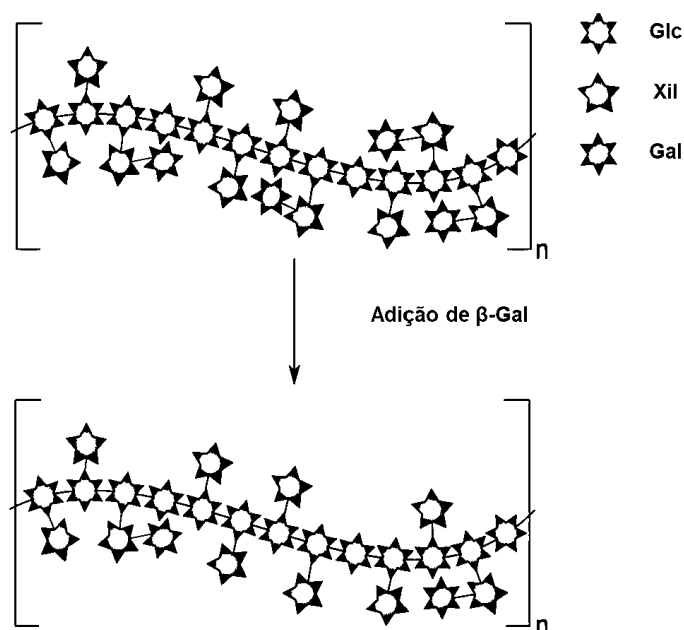
2.3 OBTENÇÃO DE HIDROGÉIS TERMO-SENSÍVEIS DE XILOGLUCANA ATRAVÉS DA REAÇÃO ENZIMÁTICA COM β -GALACTOSIDASE

A formação de uma rede reticulada termo-responsiva na XG, pode ser gerada utilizando-se a enzima fúngica β -galactosidase para remover alguns resíduos de Gal (REID et al., 1988; SHIRAKAWA et al., 1998), como esquematicamente demonstrado na FIGURA 8.

A formação das redes reticuladas ocorre porque o segmento mais hidrofílico da cadeia (porção de galactose) foi removido, com isso há uma maior interação entre os segmentos hidrofóbicos (cadeia principal) presentes. Em baixas temperaturas a cadeia polimérica de XG permanece solúvel em água. Entretanto, com o aumento da temperatura são formados agregados devido às interações hidrofóbicas. Com isso, a quantidade de água estruturada ao redor dos segmentos hidrofóbicos é reduzida e a entropia do solvente aumenta (HOARE; KOHANE, 2008). A temperatura em que ocorrerá a formação da rede reticulada é dependente do tamanho dos segmentos hidrofóbicos presentes na cadeia, da estrutura química do polissacarídeo (HOARE;

KOHANE, 2008) e da concentração do polímero (MIYAZAKI et al., 1998; NISBET et al., 2006).

FIGURA 8 - REPRESENTAÇÃO ILUSTRATIVA DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA COM β -GAL DA XILOGLUCANA DE JATOBÁ. O EFEITO DO TRATAMENTO COM β -GAL RESULTANDO EM REMOÇÃO PARCIAL DA GALACTOSE PRESENTE NA RAMIFICAÇÃO DA CADEIA PRINCIPAL DO POLISSACARÍDEO.



FONTE: Sakakibara e colaboradores, 2017.

Miyazaki e colaboradores (1998) verificaram que o aumento da concentração da solução pré-gel de 1% (m/m) a 2% (m/m) de XG gera uma diminuição da temperatura de gelificação de 27 °C para 22 °C, bem como no tempo de gelificação. Uma transição a partir de sol-gel e gel-sol, respectivamente, foram encontrados, e o gel foi considerado como termo-reversível após arrefecimento.

Em termos reológicos, porcentagens maiores de degalactosilação da XG produzem géis fortes (BRUN-GRAEPPI et al., 2010; BUSATO, REICHER, DOMENGUES SILVEIRA, 2009; NISBET et al., 2006; SIRAKAWA, YAMATOYA, NISHINARI, 1998), isto ocorre porque quanto maior a porção hidrofóbica presente na cadeia polimérica, maior será o custo entrópico para realizar a estruturação da água, maior a força motriz gerada para formar os agregados hidrofóbicos e menor a temperatura em que ocorrerá a gelificação (HOARE; KOHANE, 2008).

Brun-Grappi e colaboradores (2010) observaram que com o aumento do tempo de reação de degalactosilação da xiloglucana de tamarindo houve a formação de um gel termo-reversível. Quanto maior a taxa de remoção de galactose menor é a temperatura em que se inicia a gelificação. Através das análises de espalhamento de luz estático e dinâmico eles observaram que houve uma mudança na conformação da XGT com o aumento da porcentagem de remoção da galactose. Quanto menor a presença de Gal na estrutura da XGT menor o valor do segundo coeficiente virial (A_2) obtido, ou seja, menor a interação entre polímero-água e maior a interação entre polímero-polímero. Também foi observado uma histerese térmica devido à formação de agregados com interações fracas (LI et al., 2001) e ou de cadeias poliméricas rígidas (FANG; NISHINARI, 2003). Os géis formados apresentaram propriedades interessantes em termos biomédicos, devido à termo-reversão em si, mas também devido à baixa toxicidade e baixa imunogenicidade.

Kawasaki e colaboradores (1999) realizaram estudos dos hidrogéis formados de XG de tamarindo após remoção de 44% da galactose presente na cadeia. Esse estudo foi realizado *in vitro* e *in vivo* avaliando-se a liberação de indometacina e diltiazem adicionada à rede gelificada de XGT. A solução polimérica contendo os fármacos foram administradas via oral, e a gelificação do material ocorreu com o tempo. Os resultados obtidos mostraram que a biodisponibilidade do fármaco administrado a partir dos géis foi maior que em solução, o que torna esse hidrogel termo-reversível um potencial veículo para transporte de drogas.

Hidrogéis termo-reversíveis de XG de Tamarindo também foram avaliados como potenciais veículos para transporte de fármacos via nasal (MAHAJAN et al., 2012), via retal (MIYAZAKI et al., 1998) e administração via percutânea (TAKAHASHI et al., 2002) obtendo-se resultados satisfatórios e que os habilitam a serem empregados para esses fins.

Apesar de muitos outros estudos já terem estudado a formação de géis através da remoção enzimática de galactose, os detalhamentos reológicos das redes estruturais entre moléculas de XG degalactosiladas ainda não foram explorados. Diferentes questionamentos sobre os tipos de redes poliméricas presentes nos géis ainda permanecem incógnitos, o que justifica a continuidade dos estudos. Outro ponto a ser explorado é o fato de que a maioria dos estudos foram realizados utilizando-se a XG oriunda das sementes de Tamarindo e visto que a composição oligossacarídica, massa molar e até mesmo a conformação delas são diferentes, torna-se importante

avaliar o quanto essa diferença influenciará na formação do hidrogel termo-responsivo.

O crescente interesse por géis “inteligentes” que sejam termo-responsivos e reversíveis destinados a serem utilizados em áreas distintas, faz com que haja a necessidade do desenvolvimento de diferentes mecanismos para a obtenção desses hidrogéis. A técnica de degalactosilação da XG é a mais amplamente empregada para a formação de hidrogéis termo-responsivos e reversíveis. Há em literatura outras maneiras de se obter tais géis com por exemplo: reticulação, alteração da qualidade termodinâmica do solvente e polióis, além das já extensivamente discutidas remoções das galactoses da XG. Os artigos já reportados em literatura sobre formação de hidrogéis de XG serão descritos na sequência do texto.

2.4 OBTENÇÃO DE HIDROGÉIS TERMO-RESPONSIVOS DE XILOGLUCANA ATRAVÉS DA ADIÇÃO DE AGENTES GELIFICANTES

Yuguchi e colaboradores (2005a) desenvolveram um gel termo-reversível através da adição de iodo à solução de XG das sementes de tamarindo. Neste experimento eles obtiveram um material que em baixas temperaturas é um gel com cor azul, enquanto em altas temperaturas ele se torna uma solução de cor vermelha. A formação da rede gelificada se dá, segundo os autores, através da interação de duas cadeias de XG associadas devido à interação eletrostática com o iodo ou íons de iodo.

A gelificação da XG proveniente das sementes de tamarindo também pode ser obtida através da adição de álcool como descrito em literatura por Yuguchi e colaboradores (2004). O comportamento do gel é fortemente dependente do tipo de álcool adicionado. A adição de álcool poli-hídricos resulta em menos interações entre as cadeias, enquanto a adição de álcool mono-hídrico leva a formação de vários agregados aleatórios devido a interações mais fortes entre a XG e as moléculas de álcool. Com isso as moléculas de água presentes na camada de solvatação do polissacarídeo são excluídas e as interações entre as cadeias polissacarídicas são promovidas.

Polifenóis, em especial as unidades de éster de ácido gálico (GA), são moléculas que possuem propriedades antioxidantes e são benéficos para a saúde

humana (NAMIKI et al., 1991; MURAMATSU et al., 2002; NITTA, 2005). Tais moléculas conhecidas como análogos de galatos e a XG vem sendo estudadas por diversos autores. Nitta e colaboradores (2004) avaliaram a interação entre galato de epigallocatequina (EGCg), importante componente do chá verde, e a XG proveniente da semente de tamarindo. A formação de um gel termo-reversível foi confirmada através das análises reológicas, nas quais também se observou a formação de histerese (influência do tempo sobre os parâmetros reológicos) e a transição gel-sol devido à presença de agregados. Análises de RMN indicaram que há uma interação direta entre a XG e o EGCg, enquanto as análises térmicas mostraram que a formação do gel ocorre à temperatura de 25 °C na rampa de resfriamento e a fusão ocorre a temperatura de 45 °C na rampa de aquecimento. Segundo os autores a termo-reversão, provavelmente, dá-se através de reticulações devido às ligações de hidrogênio e a interações hidrofóbicas.

Hirun e colaboradores (2012) investigaram a termo-reversibilidade do gel formado a partir da mistura de XG de tamarindo com várias concentrações de GA. De acordo com os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) eles observaram que as interações entre a XG e o ácido gálico ocorrem devido as ligações de hidrogênio entre a hidroxila e o ácido carboxílico. Nas análises térmicas picos endotérmicos foram obtidos na rampa de aquecimento referentes a transição do estado Gel-Sol, enquanto os picos exotérmicos foram observados na rampa de resfriamento devido a transição Sol-Gel. As medidas reológicas confirmaram que a gelificação ocorreu durante o resfriamento, quando houve um aumento dos módulos elástico. Foi observado também um aumento da força do gel com o aumento da concentração de GA adicionada.

Com a finalidade de descobrir novos agentes gelificantes para a criação de produtos médicos, alimentícios e cosméticos Yan e colaboradores (2016) estudaram a adição de outros análogos de galatos à XG de tamarindo. Dentre esses os que induziram a gelificação da XG foram o galato de epigallocatequina (EGCg), galato de epicatequina (ECg), ácido gálico (GA), metil, etil e propil galato, pirogalol, p-, m- e 3, 5-di-hidroxibenzóicos.

Portanto, além da degalactosilação existem outras maneiras de induzir as interações entre as cadeias de XG para que haja a formação da rede reticulada. Com a finalidade de propor uma nova forma de promover a formação da rede gelificada entre as cadeias de XG, foi adicionado sais cosmotrópicos à solução polimérica. Deste

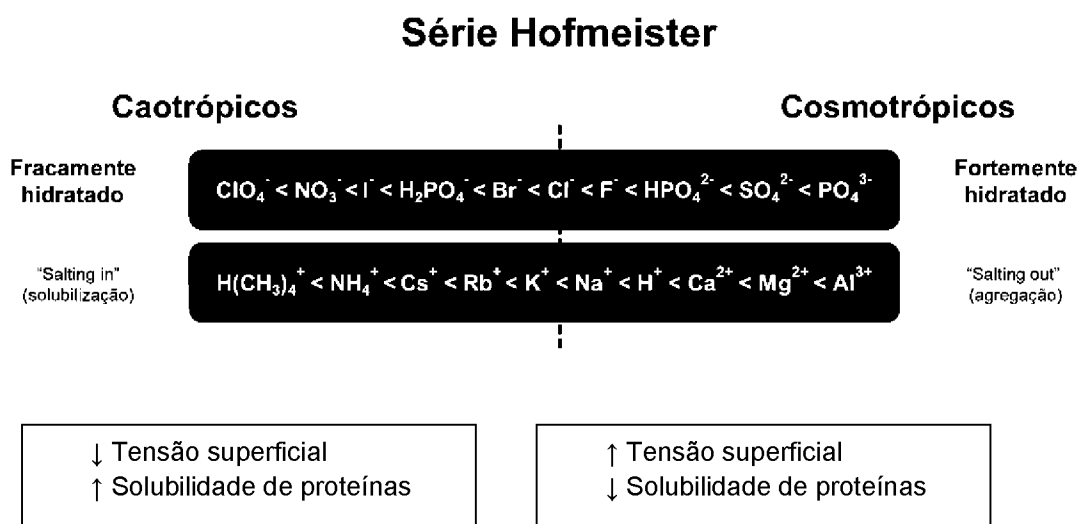
modo, amplia-se as possibilidades de obtenção desses hidrogéis termo-responsivos oriundos da XG de Jatobá, fonte utilizada no presente estudo.

2.5 OBTENÇÃO DE HIDROGEL TERMO-RESPONSIVO DE XILOGLUCANA ATRAVÉS DA ADIÇÃO DE SAIS COSMOTRÓPICOS

2.5.1 Série Hofmeister

A série Hofmeister é uma escala empírica inicialmente desenvolvida através das observações feitas por Franz Hofmeister, em 1888, sobre o efeito da precipitação (“*salting-out*”) e solubilização (“*salting-in*”) que alguns sais produziam sobre soluções aquosas de proteínas (FIGURA 9). Esses efeitos iônicos foram estudados sistematicamente pelo professor de farmacologia de Praga e colaboradores, e abordados em uma série de artigos, os quais permaneceram por mais de cem anos sem muitos estudos relacionados a eles. (KUNZ; HENLE; NINHAM, 2004).

FIGURA 9 - ÂNIONS E CÁTIONS DA SÉRIE HOFMEISTER ORDENADOS DE ACORDO COM SEU EFEITO CAOTRÓPICO OU COSMOTRÓPICO.

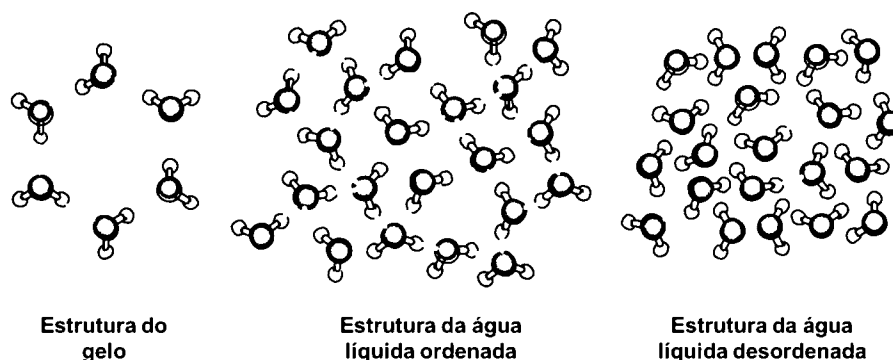


Fonte: Adaptado de Kunz, 2010.

A forte hidratação (cosmotrópico) ou fraca (caotrópico) apresentada pelos íons está relacionada com a capacidade de estruturar ou quebrar as ligações de hidrogênio formadas entre as moléculas da água, mostrada na FIGURA 10 (PLUMRIDGE; WAIGH, 2002). Íons que destroem a estrutura formada pelas ligações de hidrogênio entre as moléculas de água realizam um efeito similar ao aumento de temperatura ou pressão (LEBERMAN; SOPER, 1995).

A característica dos íons caotrópicos de realizar a quebra das estruturas da água formadas pelas ligações de hidrogênio, deve-se ao fato desses íons serem menos polares que a água. Entretanto, os mecanismos físicos envolvidos na quebra da estrutura da água devido à presença de íons caotrópicos ainda não foram completamente elucidados (GALINSKI et al., 1997; PLUMRIDGE; WAIGH, 2002; MOELBERT; NORMAND; LOS RIOS, 2004).

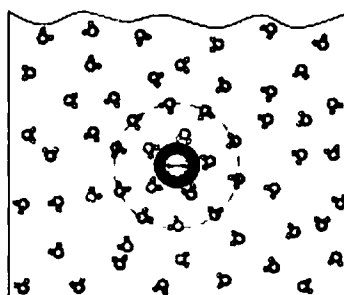
FIGURA 10 – ESQUEMA ILUSTRATIVO DA ESTRUTURA DA ÁGUA DEVIDO AO MAIOR OU MENOR NÚMERO DE LIGAÇÕES DE HIDROGÊNIO.



FONTE: Moelbert, Normand e Los Rios, 2004.

A característica dos íons cosmotrópicos é a de promover a ordenação das moléculas de água (FIGURA 11), e isto ocorre devido eles serem mais polares que a água (GALISKI; STEIN; AMENDT; KINDER, 1997; PLUMRIDGE; WAIGH, 2002). Então, quando uma molécula não polar é acrescentada à solução com íons cosmotrópicos a tendência é que eles compitam com as moléculas de água presentes na camada de solvatação oriundas dos domínios hidrofóbicos, o que pode induzir separação de fase em sistema diluído ou gelificação em sistema semi-diluído (GALINSKI et al., 1997; MOELBERT; NORMAND; LOS RIOS, 2004).

FIGURA 11 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA ESTRUTURA DE MOLÉCULAS DE ÁGUA AO REDOR DO ÂNION, MOSTRANDO O EFEITO COSMOTRÓPICO.



FONTE: Zhang e Cremer, 2006.

A adição de uma molécula com segmentos hidrofóbicos a uma solução aquosa leva à destruição das estruturas de ligação de hidrogênio, e em baixas temperaturas uma reorganização entre as moléculas de água em torno do segmento hidrofóbico gera a diminuição da entropia do sistema e o consequente aumento da solubilidade da molécula (PERSTEMILIDIS et al., 1996; JONG; WILSON; NEILSON, 1997; PRIVALOV; GILL, 1988; MOELBERT; NORMAND; LOS RIOS, 2004). Entretanto, em temperaturas mais altas, ocorre a desorganização das moléculas de água devido à diminuição de energia livre e aumento da entropia do sistema. Com a finalidade de diminuir a exposição do segmento hidrofóbico da cadeia, ocorre a agregação da molécula (LUDWIG, 2000; MOELBERT; NORMAND; LOS RIOS, 2004).

Quando um íon cosmotrópico é adicionado a este sistema o efeito da agregação hidrofóbica é aumentada, pois em termos entálpicos, é mais favorável que as moléculas de água se organizem ao redor do íon e não ao redor do segmento hidrofóbico (ARAKAWA; TIMASHEFF, 1985; SOMERO; OSMOND; BOLIS, 1992; GALINSKI; STEIN; AMENDT; KINDER, 1997; SFDERLUND; ZHU; JUTILA; KINNUNEN, 2003).

Cereser (2010) estudou o efeito de diversos sais da série Hofmeister (KCl, NaCl, MgCl₂, CaCl₂, LiCl e LiBr) sobre a viscosidade de soluções de albumina obtida da clara do ovo após a adição. Neste estudo o autor chegou à conclusão de que o efeito do ânion cosmotrópico é muito mais significativo do que o efeito do cátion cosmotrópico na precipitação de proteínas. Alexandridis e Holzwarth, (1997) obtiveram resultados similares e concluíram que o efeito cosmotrópico do cátion não é tão significativo quanto do ânion. A possível explicação para esse efeito é que,

apesar do ânion e do cátion terem o mesmo raio iônico, o hidrogênio pode se aproximar cerca de 0,8 Å mais dos ânions do que o oxigênio da água dos cátions (PLUMRIDGE; WAIGH, 2002).

Inúmeros fenômenos físico-químicos foram relatados referindo-se à utilização de íons da série Hofmeister na formação de montagens supramoleculares com ciclodextrinas (LO NOSTRO et al., 2006), no estudo da desnaturação proteica (TADEO; PONS; MILLET, 2007), na obtenção de hidrogéis responsivos ao pH (SWANN et al., 2010) e hidrogéis termo-responsivos (PAṬACHIA; FLOREA; FRIEDRICH; THOMANN, 2009).

Curleya, Hayesa, Rowana e Kennedy (2014) desenvolveram um hidrogel para implante de menisco a partir da adição de sulfato de sódio a solução de poli(álcool vinílico). Os estudos indicaram que ocorreu a formação de regiões cristalinas devido as reticulações físicas o que levou ao aumento na resistência mecânica do gel.

Joshi (2011) estudou a adição de vários íons da série Hofmeister à solução de Hidroxipropil Metilcellulose (HPMC) para a obtenção de hidrogéis termo-reversíveis. Dentre os sais estudados o Na_3PO_4 , Na_2SO_4 , NaCl e o NaBr promoveram o efeito de “*salting-out*”, resultando na termo-gelificação da HPMC. Este efeito ocorreu em consequência da competição por moléculas de água entre os íons e as cadeias de HPMC. Entretanto não foi observado a formação de hidrogel com a adição dos sais NaI e NaSCN .

A obtenção de hidrogéis através da adição de íons cosmotrópicos à solução de biopolímeros ainda não é amplamente explorada, o que despertou o interesse da realização desse estudo. Dentre os ânions, o SO_4^{2-} foi o escolhido por ser um dos mais cosmotrópicos e por já conter em literatura a possibilidade de se obter hidrogéis com polímeros sintéticos a partir da adição desse ânion (JOSHI, 2011; CURLEYA; HAYESA; ROWANA; KENNEDY, 2014; PAṬACHIA; FLOREA; FRIEDRICH; THOMANN, 2009).

O sulfato de sódio é muito utilizado na indústria química, em detergentes, papel, produtos têxteis, curtimento de couro e pode ser usado também na indústria farmacêutica. Bharmoria, Gehlot, Gupta e Kumar (2014) estudaram a solubilidade deste sal em água com o aumento da temperatura. Eles observaram que a solubilidade aumenta com o aumento da temperatura até 32,4 °C, após há uma discreta queda na solubilidade em temperaturas maiores.

2.6 REOLOGIA

A reologia descreve a deformação de um corpo sob a influência de tensões. É a ciência da deformação e do fluxo (escoamento) dos materiais, em que podemos ver 3 primários conceitos teóricos: cinemática, leis da conservação e relações constitutivas. A cinemática é a ciência do movimento, a qual descreve as mudanças na forma dos corpos com o tempo. As leis da conservação tratam das forças, tensão e vários intercâmbios de energia decorrentes do movimento. Enquanto as relações constitutivas são o elo de ligação entre o estado de tensão e o estado de deformação (TANNER, WALTERS, 1998).

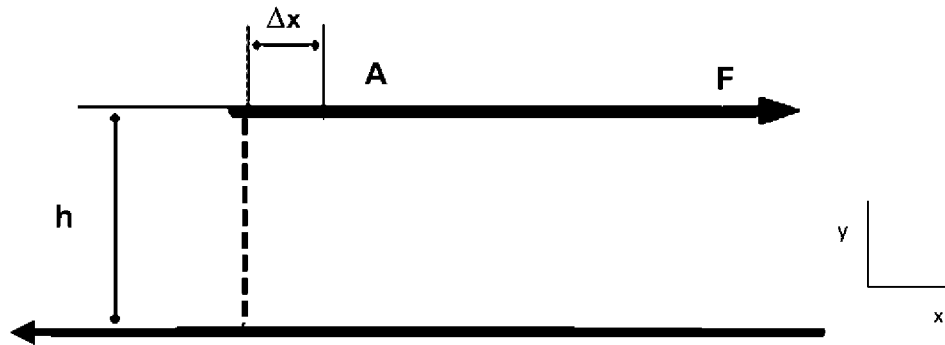
Em 1678, Robert Hooke em seu trabalho intitulado "*True Theory of Elasticity*" descreveu a teoria da elasticidade, a qual estabelece uma correlação linear entre a tensão e a deformação de sólidos ideais (TANNER; WALTERS, 1998). Portanto, para sólidos ideais toda a energia aplicada para provocar uma deformação é recuperada. (SCHRAMM, 2006).

Nove anos mais tarde, Isaac Newton (1687) na obra intitulada "*Philosophiæ Naturalis Principia Mathematica*" relata sobre líquidos e fluxo de cisalhamento constante. A Lei de Newton descreve o fluxo ideal no qual a tensão e a taxa de cisalhamento estão relacionadas através de uma proporcionalidade constante que corresponde à viscosidade (TANNER; WALTERS, 1998). Fluidos ideais compreendem os líquidos e gases que possuam uma deformação irreversível, ou seja, dissipam energia na forma de fluxo viscoso. Toda a energia aplicada para provocar a deformação é dissipada dentro do fluido em forma de calor e não pode ser recuperada com a simples remoção da tensão como ocorre com os sólidos ideais (SCHRAMM, 1994).

“A resistência advinda do atrito das partes do líquido, com outras condições inalteradas, é proporcional à velocidade com que as partes do líquido são separadas umas das outras.” Isaac Newton, 1687

Na FIGURA 12, tem-se o diagrama esquemático do cisalhamento de uma amostra. O material está contido entre duas superfícies, sendo que a inferior é fixa e a superior é livre para se mover.

FIGURA 12 - DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DO CISALHAMENTO DE UMA AMOSTRA



FONTE: O autor.

Se uma força (F) é aplicada na superfície superior na direção x , gera um fluxo na camada líquida. A tensão de cisalhamento (σ) é definida como sendo a razão entre a força aplicada e a área da seção transversal da superfície A , equação 1. A deformação de cisalhamento (γ) é definida como sendo a variação do deslocamento da camada superior (Δx) pela espessura da camada líquida (h), equação 2. (RUBINSTEIN; COLBY, 2003).

$$(1) \quad \sigma = \frac{F}{A} \quad \gamma = \frac{\Delta x}{h} \quad (2)$$

Se o material analisado é um sólido elástico, a tensão de cisalhamento e a deformação de cisalhamento são proporcionais, com a constante de proporcionalidade definindo o módulo de cisalhamento (G) ou módulo de rigidez (RUBINSTEIN; COLBY, 2003). A equação 3, corresponde à Lei de Hooke sobre elasticidade. O módulo de cisalhamento (G) corresponde à resistência de um sólido em relação à deformação. O modelo de mola é utilizado para caracterizar um sólido elástico ideal, porque após a remoção da tensão o corpo retorna a forma original (FIGURA 13) (SCHRAMM, 2006).

$$\sigma = G \cdot \gamma \quad \text{ou} \quad (\text{deformação} = G \cdot \text{tensão}) \quad (3)$$

Para materiais líquidos, a razão entre a variação da tensão ($\Delta\gamma$) e a variação do tempo (Δt) correspondem a taxa de cisalhamento, equação 4 (RUBINSTEIN; COLBY, 2003).

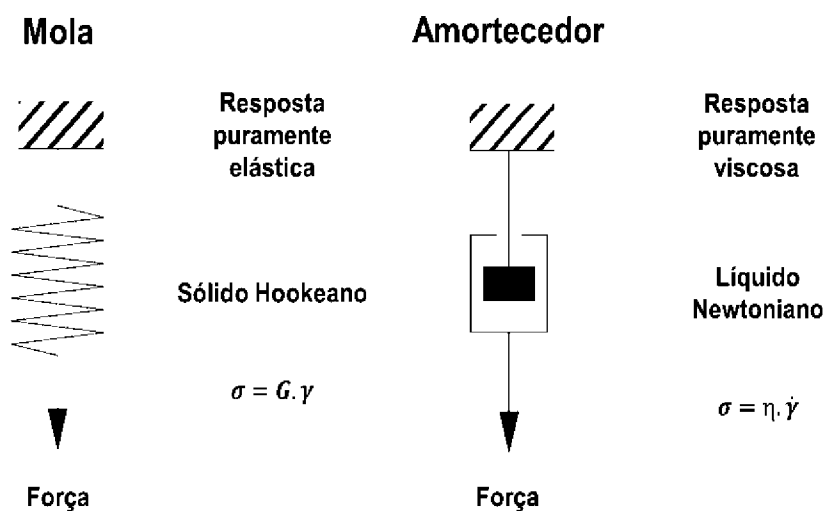
$$\dot{\gamma} = \frac{\Delta\gamma}{\Delta t} \quad (4)$$

Segundo a Lei de Newton para líquidos ideais, a viscosidade (η) é definida como sendo a tensão de cisalhamento linearmente proporcional a taxa de deformação (Equação 5). Esta correlação linear corresponde a um líquido Newtoniano, se dobramos a tensão, dobramos a taxa de cisalhamento proporcionalmente (RUBINSTEIN; COLBY, 2003).

$$\sigma = \eta \cdot \dot{\gamma} \quad (5)$$

Na FIGURA 13, tem-se o modelo de mola, para caracterizar um sólido Hookeano e o modelo de amortecedor, representado por um pistão em um cilindro cheio de óleo, para um líquido Newtoniano. Para os líquidos Newtonianos a deformação final é mantida quando a tensão é removida, e não pode ser recuperada como ocorre para sólidos Hookeanos (SCHRAMM, 2006).

FIGURA 13 – REPRESENTAÇÃO DO MODELO MOLA E AMORTECEDOR.



FONTE: Adaptado de Schramm, 1994.

2.6.1 Materiais Viscoelásticos

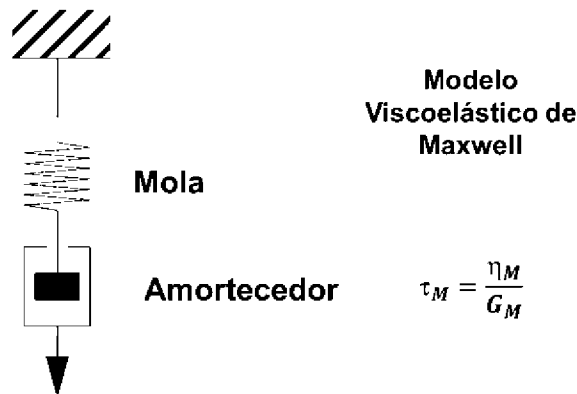
Muitos materiais comportam-se reologicamente em uma região entre sólidos Hookeanos e líquidos Newtonianos e por possuírem tanto propriedades elásticas como viscosas são denominados como materiais viscoelásticos (SCHRAMM, 1994). Na viscoelasticidade as magnitudes de tensão e deformação estão relacionadas linearmente, e o comportamento do material é descrito em função do tempo. Quando se aplica uma deformação em pequenas tensões, os arranjos moleculares nunca estarão longe do equilíbrio. A resposta mecânica gerada refere-se aos processos dinâmicos ao nível molecular, os quais ocorrem constantemente (GRAESSLEY, 1984). Barnes, Hutton e Walters (1989) afirmaram que todos os materiais podem ser considerados viscoelástico, isto vai depender da escala de tempo característico em que ocorre a deformação associada a tensão.

Na história vários filósofos e profetas trataram sobre a teoria do fluxo com o tempo. Uma famosa canção da profeta Deborah fala sobre a vitória sobre os Philisteus no livro de Juízes 5:5: *“Os montes se derretem diante do SENHOR”*. Reiner (1964), figura proeminente no desenvolvimento das conotações reológicas, propôs a definição do número não-dimensional de Deborah com base na ideia de que: *“tudo flui, se você esperar um tempo suficiente, até as montanhas”* (TANNER; WALTERS, 1998).

O número de Deborah equivale ao tempo natural de relaxação (λ) de alguns processos dividido pelo tempo de observação (t). Valores altos ($De = \lambda/t$) correspondem ao comportamento semelhante ao sólido e valores menores ($De = \lambda/t$) aos líquidos. Portanto, materiais podem apresentar comportamento tanto de sólido quanto de líquido dependendo do fator tempo de relaxação e duração do experimento. (SCHRAMM, 2006).

Existem vários modelos de mola e amortecedor utilizados para explicar o comportamento de materiais viscoelásticos. Dentre esses o mais simples é o de Maxwell que combina os elementos elásticos e viscosos ligados em série para representar os materiais líquidos viscoelásticos, FIGURA 14.

FIGURA 14 – MODELO MOLA E AMORTECEDOR DE MAXWELL PARA MATERIAIS VISCOELÁSTICOS.



FONTE: Adaptado de Schramm, 1994.

Este modelo compreende à soma dos elementos em série referentes à deformação elástica (γ_e) e viscosa (γ_v) (Equação 6 e 7). A razão entre a viscosidade do componente viscoso (η_M) e o módulo do componente elástico (G_M) define a escala de tempo, conhecida como tempo de relaxação, equação 8 (RUBINSTEIN; COLBY, 2003).

$$\gamma = \gamma_e + \gamma_v \quad (6)$$

$$\sigma = G_M \cdot \gamma_e = \eta_M \frac{\Delta \gamma_v}{\Delta t} \quad (7)$$

$$\tau_M = \frac{\eta_M}{G_M} \quad (8)$$

Existem outros modelos para definir a resposta viscoelástica, como o modelo de Kelvin-Voigt que combina o sistema de mola e amortecedor ligado em paralelo para caracterizar materiais sólidos viscoelásticos. E o modelo de Burger, mais complexo, que é a combinação do modelo de Kelvin-Voigt e Maxwell (SCHRAMM, 2006).

2.6.2 Testes dinâmicos oscilatórios

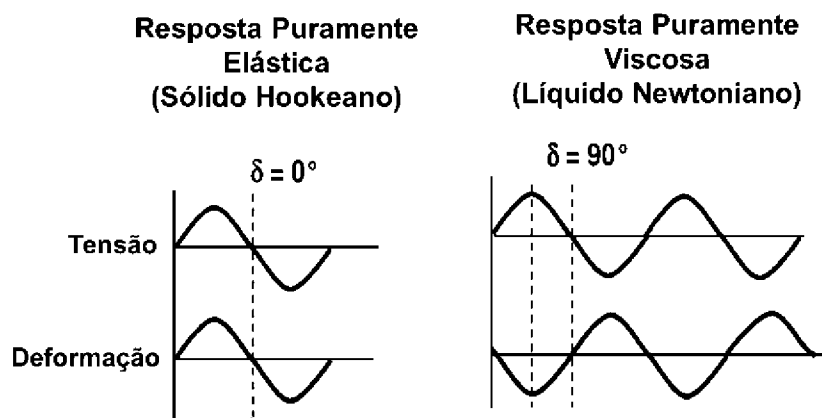
Polímeros são materiais viscoelásticos que possuem propriedades entre líquidos Newtonianos e sólidos Hookeanos (RUBINSTEIN; COLBY, 2003). Os testes

de oscilação forçada fornecem dados de viscosidade e elasticidade dos polímeros em relação à frequência aplicada. A vantagem de se realizar testes dinâmicos oscilatórios é que a estrutura interna do material não é rompida, pois as amostras são avaliadas com a estrutura em repouso (SCHRAMM, 2006).

Os testes dinâmicos oscilatórios tornaram-se um mecanismo importante para a caracterização de géis. Este método reológico é interessante também na identificação da transição sol-gel ou gel-sol em hidrogéis termo-sensíveis (HIRUN et al., 2012).

Nos testes de oscilação forçada, uma deformação oscilatória senoidal é aplicada a uma amostra. O ângulo de fase (δ), ou a defasagem, entre a deformação e a resposta é medido. Sólidos de Hooke, quando submetidos a uma dada frequência, possuem tensão e deformação oscilatória na mesma fase ($\delta = 0^\circ$). Enquanto que líquidos Newtonianos estão fora de fase ($\delta = 90^\circ$) (FIGURA 15) (RUBINSTEIN; COLBY, 2003).

FIGURA 15 – TENSÃO (STRESS) E DEFORMAÇÃO (STRAIN) OSCILATÓRIA PARA SÓLIDOS HOOKEANOS E LÍQUIDOS NEWTONIANOS.



FONTE: <http://www.unicap.br/home/wp-content/uploads/2010/07/aula-2.pdf>

A tensão em um experimento dinâmico é referenciada como tensão complexa ou módulo complexo que se refere à deformação total do material (G^*). O módulo complexo pode ser separado em dois componentes, o módulo elástico em fase com a deformação ($G' = G^* \cdot \cos\delta$) e o módulo viscoso fora de fase com a taxa de deformação ($G'' = G^* \cdot \sin\delta$). O módulo elástico ou de armazenamento (G') indica que a energia de tensão é temporariamente armazenada durante o teste, enquanto o

módulo viscoso ou de perda (G'') é devido ao fato da energia usada para iniciar o fluxo ser irreversivelmente perdida (SCHRAMM, 2006). Winter e Chambon (1986) propuseram que o ponto de gelificação corresponde à quando o $G' \cong G'' \cong \omega$.

2.7 ANÁLISES DE MICROCALORIMETRIA DE VARREDURA DIFERENCIAL

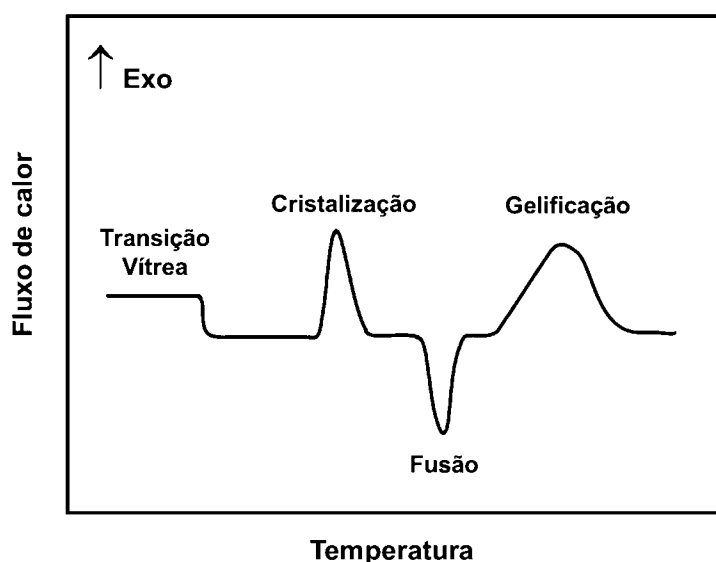
Os efeitos térmicos de liberação ou absorção de calor podem ser ocasionados por transições físicas ou reações químicas as quais geram uma variação correspondente na entalpia (SCHAWWE et al., 2000). A calorimetria diferencial de varredura (DSC) fornece informações sobre essa variação de entalpia pelo tempo (dH/dt) através da medição da diferença entre o fluxo de calor do compartimento da amostra e da célula de referência em função da variação da temperatura ou tempo (LUCAS; SOARES; MONTEIRO, 2001). Portanto, essa técnica utiliza a diferença de temperatura originada entre a amostra e a referência para calcular o fluxo de calor. Um evento endotérmico corresponde ao fluxo de calor indo para a amostra, ao passo que eventos exotérmicos ao fluxo de calor saindo da amostra para a vizinhança (MENCZEL; PRIME, 2009).

Nos processos endotérmicos (fusão, transição de fase, evaporação, desnaturação) ocorre um aumento na absorção de energia levando ao aumento da entalpia, enquanto nos processos exotérmicos (cristalização, gelificação, decomposição, agregação) a entalpia e a energia interna do sistema decrescem. A alteração no sistema termodinâmico para outra fase devido a mudança de temperatura ou pressão, é conhecida como transição de fase (FIGURA 16). Os eventos térmicos de fusão, evaporação, desnaturação, cristalização, gelificação, decomposição, agregação são caracterizados como sendo transição de primeira ordem.

A transição vítrea (T_g) não é considerada uma transição de fase de primeira ordem, mas um fenômeno cinético ou uma transição de segunda ordem. A T_g é uma temperatura (ou faixa de temperatura) em que há uma transição de fase da região amorfa do polímero de um estado vítreo (*glassy state* em inglês) para um estado borrachoso, flexível, quando aquecido. Assim, abaixo da temperatura de T_g o polímero é vítreo e rígido com limitada movimentação molecular e acima da T_g , a

estrutura polimérica é móvel, e em larga escala, a movimentação molecular é possível (MENCZEL; PRIME, 2009).

FIGURA 16 – EXEMPLOS DE EVENTOS ENDO E EXOTÉRMICOS QUE PODEM SER OBSERVADOS ATRAVÉS DAS ANÁLISES DE CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC).



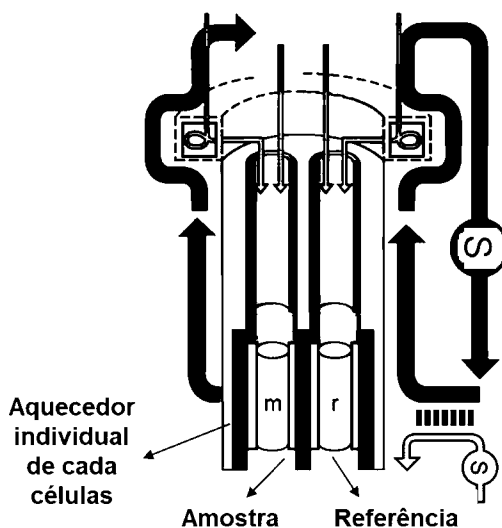
FONTE: Adaptado de Creative proteomics, 2018 (<https://www.creative-proteomics.com/support/dsc-based-analysis-service.htm>).

Existem dois tipos de DSC convencionais, por fluxo de calor e por compensação de energia. O primeiro evoluiu da análise térmica diferencial (DTA) e possui um sistema de obtenção dos dados semelhante a este realizado através de detectores termoelétricos (MENCZEL; PRIME, 2009). Nas análises por DSC por compensação de energia a variação de temperatura entre a amostra e a referência é compensada para manter a diferença de temperatura entre essas a zero. Portanto, neste sistema é a capacidade de compensação que é medida (CAVICCHI et al., 2004).

O sistema do μ -DSC está representado na FIGURA 17, consiste basicamente de bloco calorimétrico composto por um cilindro de metal banhado a ouro com alta condutividade térmica com dois recipientes, um correspondente à amostra e outro à referência. Estes estão inseridos em um forno termostaticado com undecano à temperatura controlada, e para evitar a condensação da água o sistema é colocado sob atmosfera inerte de nitrogênio. Ao redor de cada recipiente há um detector de superfície, esses transdutores mantêm a temperatura dos recipientes idênticas ao do bloco calorimétrico. O sinal elétrico obtido é proporcional à transferência de calor entre

o recipiente da amostra e os dados do bloco calorimétrico (CERDEIRINÃA et al., 2000; SETARAM, 2000a).

FIGURA 17 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO COMPARTIMENTO DO μ -DSC POR COMPENSAÇÃO DE ENERGIA.



FONTE: SETARAM, 2000b.

A técnica de DSC pode ser empregada em diversas áreas como a farmacêutica, biológica, caracterização de polímeros, dentre outras. A investigação das propriedades termodinâmicas tem sido utilizada na caracterização de membranas fosfolipídicas (SMITH; DEA, 2013), fármacos (MAHAJAN; GUNDARE, 2014), desnaturação proteica (ARNTFIELD; MURRAY, 1981), polissacarídeos (SIMI; ABRAHAM, 2010a; SIMI; ABRAHAM, 2010b), interações entre biopolímeros e proteínas (YANG; ASHTON; KASAPIS, 2015), avaliação de géis oftálmicos (NAYAK; BHARANI; SOGALI; THAKUR, 2012), transição sol-gel de biopolímeros (NÚÑEZ-SANTIAGO; TECANTE, 2007).

Nitta e colaboradores (2004) adicionaram epigalato de catequina (EGCg) a XG proveniente das sementes de tamarindo e avaliaram a gelificação através de análises reológicas e calorimetria diferencial de varredura. Eventos exotérmicos foram obtidos nas curvas de DSC durante o resfriamento indicando que houve a gelificação do material, enquanto a fusão deste é observada nas curvas de aquecimento. Com o aumento da concentração de EGCg há uma diminuição na temperatura em que ocorre

a gelificação e um incremento nos módulos de elasticidade, indicando que há um acréscimo no número de agregação.

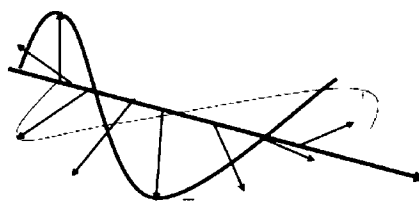
A indução de gelificação da hidroxipropil-metilcelulose com a adição de sais da série Hofmeister foi estudada por Joshi (2011). Os géis foram formados em condições salinas simulando os fluidos gástrico e intestinal com a finalidade de desenvolver suportes para a liberação controlada de droga. Os resultados de microcalorimetria mostraram que os géis formados com sais cosmotrópicos eram mais fortes do que aqueles formados com géis caotrópicos.

2.8 DICROÍSMO CIRCULAR

O dicroísmo circular é uma técnica espectroscópica que corresponde a absorção diferenciada da luz polarizada no sentido horário e ou anti-horário que ocorre quando uma molécula contém um ou mais centros quirais cromóforos (grupos que absorvem luz) (MURAKAMI; RULLER, 2016).

As moléculas quirais são formadas por um carbono ligado a quatro grupos diferentes o que caracteriza um átomo de carbono quiral ou opticamente ativo (CHAMPE; HARVEY; FERRIER, 2009; ROSS-MURPHY, 1994). A radiação eletromagnética também tem característica quiral, como uma luz circular polarizada (ROSS-MURPHY, 1994). Na luz circular polarizada os vetores E de duas ondas eletromagnéticas corresponde a $\frac{1}{4}$ do comprimento de onda o qual está fora de fase e são perpendiculares. O vetor que é a soma dos vetores E dos dois componentes gira de modo que sua ponta segue um caminho helicoidal (linha pontilhada) (FIGURA 18). Enquanto que a luz polarizada linear possui direção do vetor campo elétrico constante, a luz polarizada circular tem a direção do campo elétrico variada de duas formas, no sentido horário e anti-horário (WRIGGERS, 2015).

FIGURA 18 – ESQUEMA DA LUZ CIRCULAR POLARIZA.



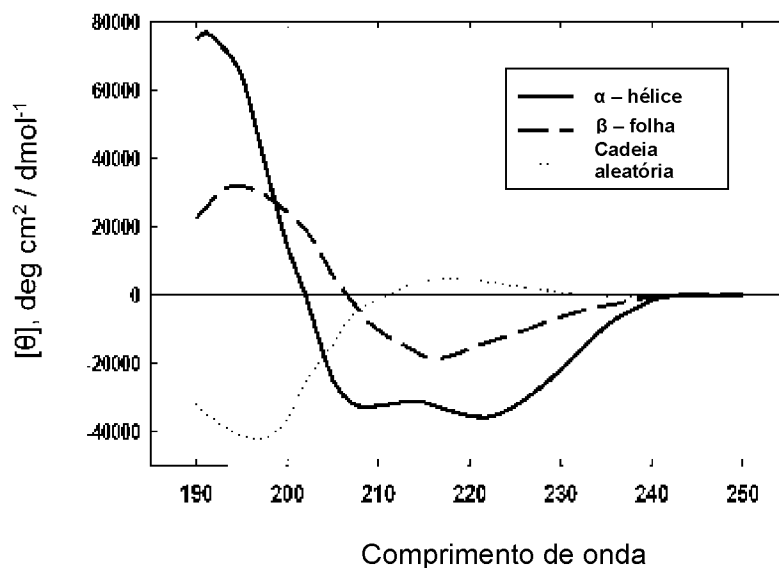
FONTE: Wriggers, 2015.

Portanto, a base do dicroísmo circular (CD) consiste na medição da diferença na absorbância da luz polarizada circularmente no sentido horário e ou anti-horário de moléculas que absorvem em comprimentos de onda nos quais a absorção ocorre (ROSS-MURPHY, 1994; WRIGERS, 2015). Os sinais no espectro de CD surgem devido à interação entre diferentes dipolos de transição fazendo a absorção devido à orientação relativa de diferentes grupos no espaço. (WRIGERS, 2015).

Uma vasta quantidade de moléculas biológicas possui centro estereogênico, o que possibilita a utilização da técnica de CD no estudo destas. Os trabalhos utilizando CD estão voltados para a caracterização da estrutura secundária de proteínas (FIGURA 19), para o monitoramento da estabilidade proteica em diversas variações de condições, como térmica, pH, força iônica ou solvente, investigações de interações proteína-proteína e proteína-ácido nucleico, estudo de mudanças conformacionais induzidas por ligantes e conformação de carboidratos (GREENFIELD, 2006; WRIGERS, 2015; VAN DER KAR, 2012; SCHOELER et al., 2006).

A conformação de carboidratos não possui estruturas definidas como as que foram mostradas na FIGURA 19 correspondentes as estruturas secundárias de proteínas. Entretanto, eles podem possuir cadeias rígidas estendidas (celulose), desordenadas ou flexíveis (JÓ et al., 2010).

FIGURA 19 – SINAL DO ESPECTRO DE CD PARA OS DIFERENTES TIPOS DE ESTRUTURAS SECUNDÁRIAS DE PROTEÍNAS.



FONTE: Wrigers, 2015.

Yin e colaboradores (2008) avaliaram o efeito da adição de alguns sais da série de Hofmeister sobre a gelificação do polissacarídeo konjac glucomannan (KGM). Além das análises sobre a viscoelasticidade do gel formado, foi-se investigado o efeito da adição do sal sobre a conformação da KGM utilizando a técnica de CD. Neste estudo conclui-se que a gelificação ocorreu devido ao aumento das associações intermoleculares e não a alteração na conformacional da cadeia de KGM.

Com base no que foi exposto, o presente trabalho tem como objetivo estudar o efeito da degalactosilação enzimática da XGJ, o qual será apresentado no capítulo 1. No capítulo 2, será apresentado o estudo sobre o resultado da adição de um ânion cosmotrópico sobre a solução de XGJ, e a obtenção de um hidrogel termo-reversível.

CAPÍTULO 1

**GELIFICAÇÃO TÉRMICA DA XILOGLUCANA INDUZIDA
POR DEGALACTOSILAÇÃO: ASPECTOS CINÉTICOS E
ESTRUTURAIS**

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

- Estudar a gelificação térmica da xiloglucana de jatobá induzida pela degalactosilação enzimática.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar por reologia a degalactosilação da xiloglucana de jatobá (XGJ) usando a enzima β -galactosidase.
- Analisar por reologia a cinética de gelificação durante a degalactosilação em concentrações diferentes de XGJ e de enzima.
- Investigar o efeito da massa molar sobre a formação do hidrogel obtido através da reação de degalactosilação de XGJ.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

A xiloglucana foi extraída a partir das sementes de jatobá (*Hymenaea courbaril*), provenientes de Cuiabá, no estado de Mato Grosso do Sul, doadas pela EMBRAPA CERRADOS. Resumidamente, as sementes de jatobá foram moídas, despigmentadas e deslipidificadas sobre refluxo com éter etílico em sistema *Soxhlet*. O isolamento da XG foi realizado através de extração aquosa exaustiva em *blender*, seguido de filtração em pano de *nylon*, centrifugação a 10^4 g, 40 °C por 30 min, seguido de precipitação com concentrações crescentes de etanol de 70% a 100% em solução aquosa, para posterior secagem a vácuo a 40°C (FREITAS *et al.*, 2015).

4.2 PURIFICAÇÃO DA XILOGLUCANA

A xiloglucana de Jatobá (XGJ) foi solubilizada em água ultrapura (Millipore) na concentração de 40 g L⁻¹ e sob agitação constante por 48 h, 4 litros foram preparados nestas condições. Após este período a solução foi centrifugada a 10^4 g por 30 min à temperatura de 40 °C. O sobrenadante foi então precipitado com 2 volumes de etanol 99% e em seguida lavado 2 vezes com etanol 99% e 1 vez com acetona 99%. O material resultante foi seco em estufa a vácuo a 40 °C por 12 h.

4.3 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA COM ENDOGLUCANASE II

A partir da hidrólise enzimática da XGJ foram obtidas duas massas molares diferentes. O tratamento do polissacarídeo ocorreu em solução aquosa com 9×10^{-5} U mL⁻¹ da enzima endo-1,4-β-D-glucanase II (EG II) (Megazyme, Bray Co., Wicklow), durante os tempos de 30 min e 20 h (SPIER *et al.*, 2015), a concentração polimérica de 1 mg mL⁻¹. Os polímeros obtidos após o tratamento com a enzima EGII foram precipitados com 3 volumes de etanol 99%, 1 volume de acetona 99% e secos

em estufa a vácuo por 12 horas à temperatura de 40 °C, e caracterizados por cromatografia de exclusão por tamanho.

4.4 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO POR TAMANHO

A caracterização macromolecular da XGJ e dos hidrolisados com a enzima EGII com tempo de 30 min e 20 h foram realizadas por Cromatografia de exclusão por tamanho (SEC), a qual forneceu informações sobre a massa molar média ponderal (M_w) e a dispersão ($\bar{D} = M_w / M_n$). A coluna cromatográfica utilizada foi a de polimetacrilato da Shodex OHpak SB-806 HQ acoplada em série ao equipamento da Viscotek Dual Detector, modelo 270, este possui um detector de viscosidade e espelhamento de luz em baixo ângulo a 7° (LALS – *Low Angle Light Scattering*) e ângulo de 90° (RALS – *Right Angle Light Scattering*) com comprimento de onda de $\lambda = 632,8$ nm. Ao sistema cromatográfico conjuntamente estava acoplado um refratômetro diferencial da Viscotek, modelo VE3580, o qual também foi usado para determinar as variações do índice de refração em função da concentração polimérica. Todos os dados foram obtidos e tratados utilizando o software OmniSEC 4.7.

Para a realização dos experimentos foi utilizada, como fase móvel, uma solução aquosa de nitrato de sódio (NaNO_3) na concentração de 0,1 mol L⁻¹ com 200 ppm (m/v) de azida de sódio (NaN_3) para evitar a proliferação microbiana. As amostras foram solubilizadas na concentração de 1,0 mg mL⁻¹ na mesma fase móvel utilizada no sistema cromatográfico e posteriormente filtradas em membrana de acetato de celulose com tamanho do poro de 0,22 µm. As análises foram realizadas com fluxo de 0,4 mL min⁻¹ e para a verificação da calibração foram usados os padrões de poli(óxido de etileno) (PEO - 22.000 g mol⁻¹) e Dextrana (70.000 g mol⁻¹).

4.5 DEGALACTOSILAÇÃO ENZIMÁTICA DA XILOGLUCANA

A XGJ foi tratada com a enzima β -galactosidase (β -gal), proveniente do fungo *Aspergillus niger* e comprada da empresa Megazyme (Bray, Co. Wicklow, Ireland). A reação enzimática ocorreu em pH 5,0, à temperatura de 50 °C e com diferentes concentrações β -gal: 0,32, 0,64, 3,2, 6,4, 9,6 e 16 U mL⁻¹, em volume de 2 mL da amostra. O pH foi ajustado utilizando-se uma solução de HCl 0,1 mol L⁻¹. Observou-se que os ensaios de tratamento enzimático a pH 7,0 ao invés do pH descrito em

literatura com sendo ótimo da enzima (pH 5,0) resultaram na formação de géis com as mesmas propriedades. A reação de degalactosilação enzimática também foram realizadas com os derivados da XGJ com M_w menores, hidrolisadas com EGII nos tempos de 30 min e 20 h. A reação de degalactosilação foi realizada e monitorada em tempo real, através das medidas em reômetro dos módulos elástico (G') e viscoso (G'') em função do tempo de reação.

4.6 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE GALACTOSE

A composição monossacarídea da XGJ nativa e da degalactosilada foi determinada usando o método de hidrólise para polissacarídeos descrito por Dai e colaboradores (2010). A XGJ com concentração de 4 mg mL^{-1} foi hidrolisada com 4 mol L^{-1} de ácido trifluoroacético (TFA) em proporção de 1:1, estes foram adicionados em uma ampola sob atmosfera de nitrogênio, a qual foi selada e mantida a 100°C por 2 h. Após este processo a ampola foi arrefecida até a temperatura ambiente e 2 mL de metanol foram adicionados a solução com os monossacarídeos sob um fluxo de ar quente com a finalidade de remover o TFA. Esta etapa foi repetida 3 vezes para garantir a remoção completa do ácido da amostra.

A XGJ hidrolisada foi dissolvida em água ultrapura na concentração de 1 mg mL^{-1} e filtradas utilizando-se o filtro da Millipore com tamanho do poro de $0,22 \mu\text{m}$. As amostras foram injetadas em um cromatografia de troca aniônica com detecção amperométrica pulsada (HPAEC), utilizando injetor automático modelo AS-DV com capacidade para até 50 amostras, fabricante Thermo Scientific. O equipamento utilizado para realizar as análises é do modelo: ICS-5000 com eletrodo ED de ouro, fabricante Thermo Scientific. A coluna utilizada foi a Dionex CarboPac™ PA20 Analytica ($3 \times 150 \text{ mm}$), fabricante Thermo Scientific (Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular/UFPR). As condições de análises estão descritas na TABELA 1:

TABELA 1 - CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS PARA A QUANTIFICAÇÃO DOS MONOSSACARÍDEOS PRESENTES NAS AMOSTRAS DE XGJ

| Tempo (min) | Fluxo (mL min ⁻¹) | Hidróxido de sódio (%) solução 1 mol L ⁻¹ | Acetato de sódio (%) solução 1 mol L ⁻¹ |
|-------------|----------------------------------|--|--|
| 0,001 | 0,2 | 0,2 | 0,4 |
| 0,500 | 0,2 | 0,1 | 0,4 |
| 30,000 | 0,2 | 0,1 | 0,4 |
| 30,001 | 0,2 | 0,1 | 5,0 |
| 45,000 | 0,2 | 0,1 | 20,0 |
| 45,001 | 0,2 | 20,0 | 0,0 |
| 51,001 | 0,2 | 20,0 | 0,0 |
| 51,002 | 0,2 | 0,2 | 0,4 |
| 62,002 | 0,2 | 0,2 | 0,4 |

O tempo de retenção e a curva padrão foram construídos utilizando-se padrões monossacarídeos de galactose (Gal), xilose (Xyl) e glucose (Glc). Os valores referentes ao tempo de retenção, coeficiente angular (a) e linear (b) obtidos para realizar os cálculos estão descritos na TABELA 2. A partir destes e dos valores das áreas de cada pico das amostras, quantificou-se os açúcares através a equação da reta.

TABELA 2 – TEMPO DE RETENÇÃO E VALORES REFERENTES AO COEFICIENTE ANGULAR E LINEAR, OBTIDOS A PARTIR DA CURVA PADRÃO DOS MONOSSACARÍDEOS DE GALACTOSE, XILOSE E GLUCOSE

| Padrões | Tempo de Retenção (min) | Coeficiente linear (a) | Coeficiente angular (b) | R ² |
|-----------|-------------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------|
| Galactose | 23 (± 0,5) | 0,000 | 4532,57 | 0,999 |
| Glucose | 22 (±0,5) | 0,000 | 4526,21 | 0,999 |
| Xilose | 26 (± 0,5) | 0,000 | 4819,24 | 0,995 |

4.7 MEDIDAS RELÓGICAS

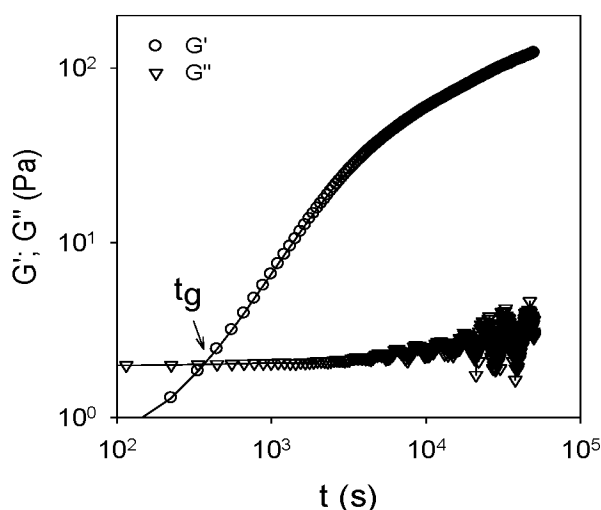
As análises dinâmicas foram feitas usando dois reômetros comerciais: HR-3 Discovery Rheometer, TA instrumentos (New Castle, DE, USA) ou Thermo Scientific Haake Rheostress 1 (Karlsruhe, Germany), equipados com geometria de cone placa (40 mm diâmetro, 2°). O módulo de cisalhamento foi mensurado, em tempo real, durante a degalactosilação com uma frequência angular de $\omega = 1 \text{ rad s}^{-1}$. O estresse imposto foi escolhido de acordo com a resposta do regime linear ($\sigma = 0,1 \text{ Pa}$), outros valores podem ser utilizados, entretanto estarão especificados. A reação foi interrompida pelo aquecimento da amostra à temperatura de 90 °C durante 10 min para que ocorresse a desnaturação da enzima, levando à inativação desta. Para que não acontecesse a evaporação do solvente da amostra, a geometria foi coberta com uma camada de óleo mineral. As rampas de aquecimento-arrefecimento foram realizadas usando uma taxa de 0,5 °C min⁻¹ ou a cada 10 °C, sem qualquer diferença nos módulos de cisalhamento.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 GELIFICAÇÃO DA XILOGLUCANA DURANTE A DEGALACTOSILAÇÃO

Inicialmente, será discutido o efeito da degalactosilação na XGJ nativa com $M_w = 3,0 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$ e após o efeito ocorrido quando se utiliza XGJ hidrolisadas enzimaticamente (com menores massas molares). Diferentes quantidades de enzima foram adicionadas a solução de XGJ a 10°C e concentração de 10 mg mL^{-1} . Estas soluções foram colocadas no reômetro onde gradualmente a temperatura do banho termostático foi elevada até 50°C , em 30 min, a qual permaneceu constante. A evolução do módulo de cisalhamento foi monitorada a uma frequência angular de $\omega = 1 \text{ rad s}^{-1}$ em função do tempo. Um exemplo de evolução do G' e G'' após adição da enzima ($C_{\text{enz}} = 16 \text{ U mL}^{-1}$) está mostrada na FIGURA 20.

FIGURA 20 - G' E G'' EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA XGJ ($M_w = 3,0 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$) NA CONCENTRAÇÃO DE 10 mg mL^{-1} E β -GAL NA CONCENTRAÇÃO DE 16 U mL^{-1} , À TEMPERATURA DE 50°C . O TEMPO DE GELIFICAÇÃO (t_g) ESTÁ INDICADO NA FIGURA.



O módulo elástico G' aumenta com o tempo e cruza com o módulo viscoso G'' indicando a formação do gel. Neste trabalho, definiu-se o tempo de gelificação (t_g) como o correspondente ao tempo em que as curvas de G' e G'' se cruzam, a $\omega = 1 \text{ rad s}^{-1}$.

Como seria de esperar, a taxa de gelificação aumentou com o acréscimo da concentração da enzima, FIGURA 21a, mas curiosamente, os resultados obtidos em diferentes concentrações de enzimas podem ser superpostos pela normalização do eixo do tempo pelo tg, ver FIGURA 21b. Isto significa que a concentração da enzima só influenciou a cinética da reação, mas não a rigidez do gel. A interseção da FIGURA 21b mostra o recíproco do tempo de gelificação ($1 / t_g$) como uma função direta da concentração de enzima. A gelificação aumentou linearmente com a C_{enz} , o que é esperado se a taxa de gelificação for proporcional à taxa de degalactosilação, porque a última é proporcional a C_{enz} em baixas concentrações de enzimas.

Em paralelo, a fração de Gal liberada em relação à quantidade total de monossacarídeos (Glc + Xyl + Gal) foi determinada ao longo do tempo, durante a reação enzimática utilizando $C_{enz} = 16 \text{ U mL}^{-1}$. Durante a hidrólise da XGJ, alíquotas foram retiradas de tempos em tempos e analisadas através da técnica de HPAEC como descrito nos materiais e métodos, e a determinação da porcentagem de Gal na XGJ está apresentada na FIGURA 22. Os resultados são comparados com a evolução dos módulos de cisalhamento na FIGURA 21b e mostram que G' começou a aumentar acentuadamente já em baixos graus de degalactosilação. O módulo elástico continuou a aumentar lentamente quando a fração de Gal foram removidas, entretanto não houve aumento significativo ao final do processo, o que sugere que as redes reticuladas continuaram a ser formadas lentamente dentro da rede XGJ após a conclusão da reação enzimática.

FIGURE 21 - a. DEPENDÊNCIA DO TEMPO DO G' DURANTE A DEGALACTOSILAÇÃO A 50 °C PARA A XILOGLUCANA COM $M_W = 3 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$ EM SOLUÇÃO COM $C = 10 \text{ mg mL}^{-1}$ E EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE β -GAL INDICADAS NA FIGURA.

b. RESULTADOS MOSTRADOS NA FIGURA 3a. PLOTADOS EM FUNÇÃO DE t/t_g . A PORCENTAGEM DE DEGALACTOSILAÇÃO NA $C_{ENZ} = 16 \text{ U mL}^{-1}$ É MOSTRADA EM COMPARAÇÃO COM A FUNÇÃO DE t/t_g NA MESMA FIGURA (DIAMANTES VERDES). Os pontos em vermelho foram obtidos em experimentos independentes apresentados na figura 24a.

c. $1/t_g$ EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ENZIMA β -GAL PARA XILOGLUCANA EM SOLUÇÃO A $C = 10 \text{ mg mL}^{-1}$ E $T = 50 \text{ °C}$.

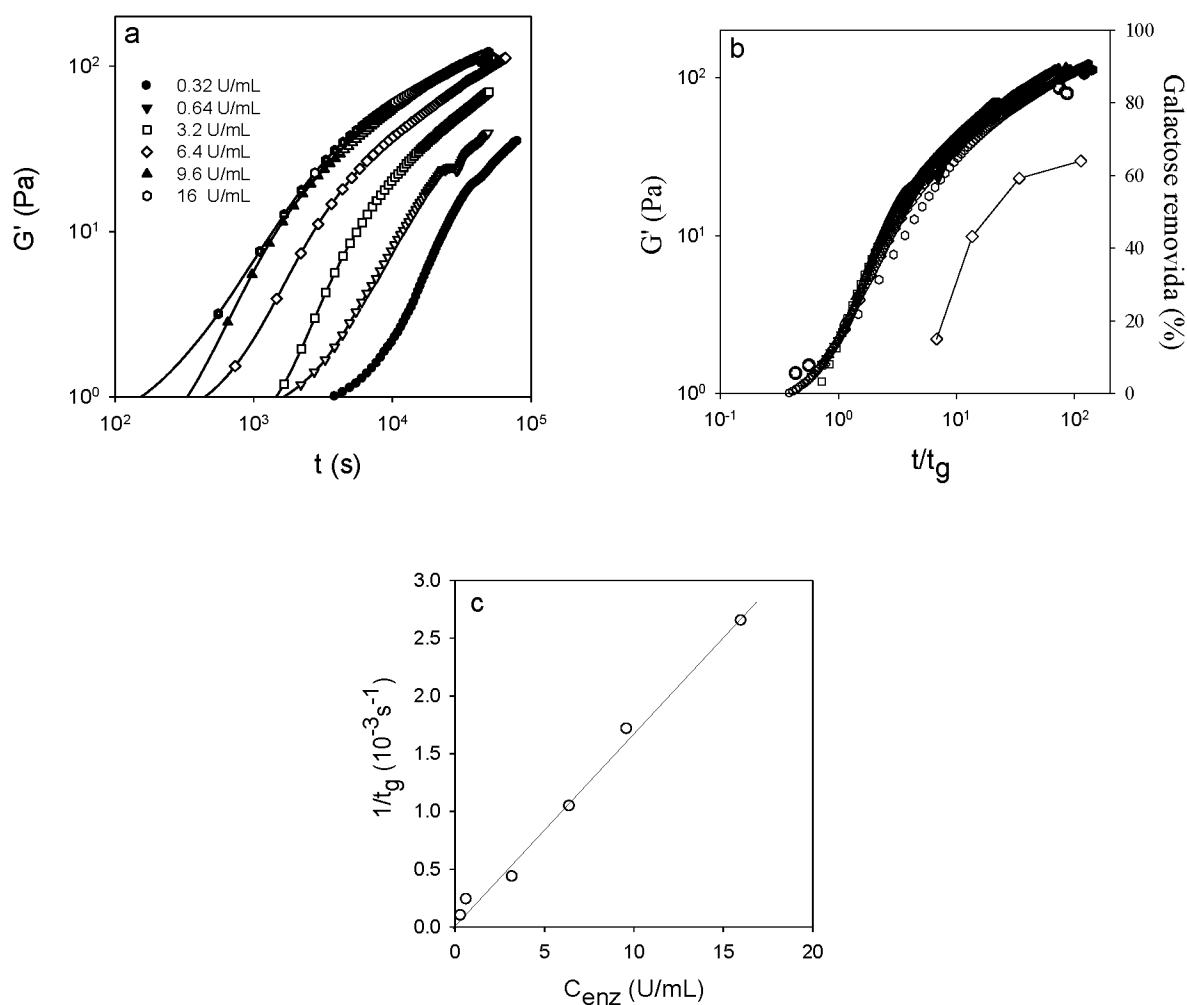
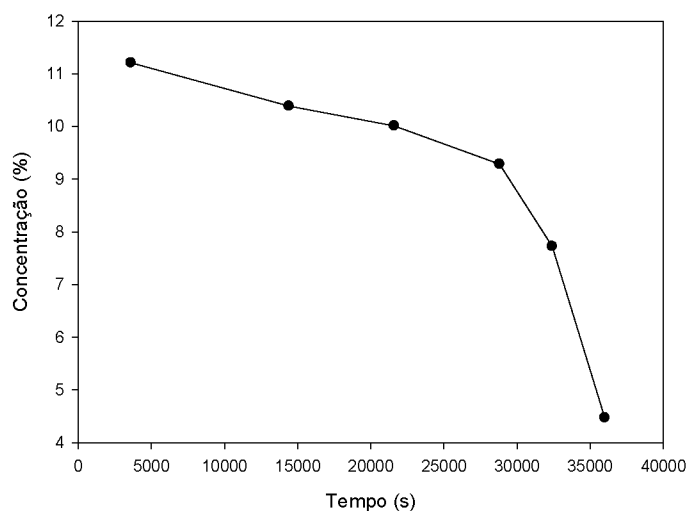
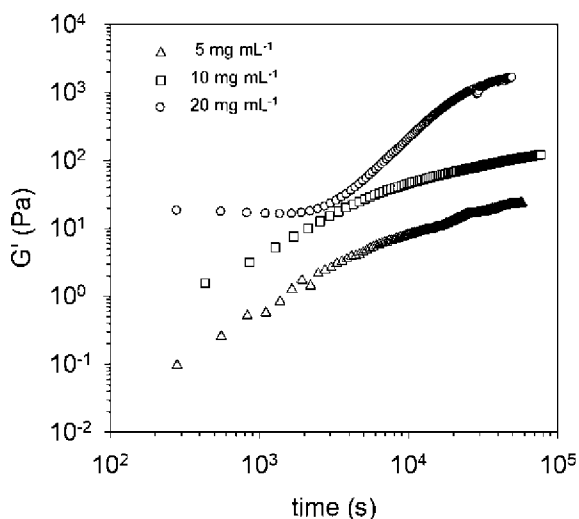


FIGURA 22 – CONCENTRAÇÃO EM PORCENTAGEM RELATIVA DO MONOSSACARÍDEO DE GALACTOSE AO LONGO DA REAÇÃO ENZIMÁTICA COM β -Gal A $C_{ENZ} = 16 \text{ U mL}^{-1}$ PELO TEMPO EM SEGUNDOS. DADOS OBTIDOS ATRAVÉS DA TÉCNICA DE HPAEC.



O efeito da concentração da XGJ na evolução do G' durante a degalactosilação é demonstrado na FIGURA 23, na qual o G' é plotado em função do tempo após a adição da enzima a $C_{enz} = 6,4 \text{ U mL}^{-1}$ para soluções de XGJ com concentrações de 5 mg mL^{-1} , 10 mg mL^{-1} e 20 mg mL^{-1} . A rigidez dos géis aumentou fortemente com o aumento da concentração de XGJ, o que está de acordo com os resultados descritos em literatura. Observa-se que, na maior concentração de XGJ investigada, o módulo de armazenamento da rede formada por XGJ nativa já era significante elevado em $\omega = 1 \text{ rad s}^{-1}$, o que explica o valor relativamente constante do G' durante os primeiros $2 \times 10^3 \text{ s}$ para essa amostra.

FIGURA 23 - EVOLUÇÃO DO MÓDULO DE ARMAZENAMENTO COM O TEMPO A 50 °C APÓS ADIÇÃO DE 6.4 U mL⁻¹ DA β -GAL, PARA SOLUÇÕES DE XGJ COM $M_w = 3 \times 10^6$ g mol⁻¹ COM SOLUÇÕES EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES COMO INDICADO NA FIGURA.

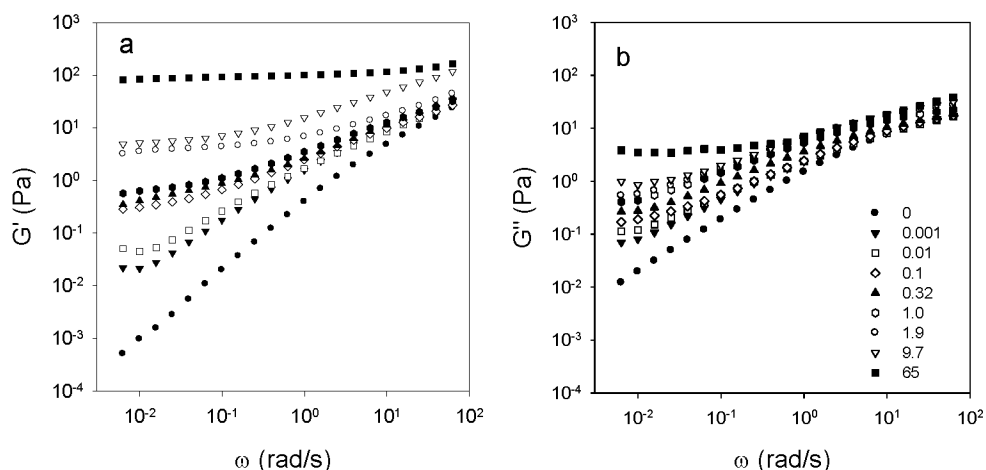


Estudou-se a dependência da frequência dos módulos de cisalhamento das soluções XGJ em solução durante o tratamento enzimático, explorando o fato de que a cinética pode ser controlada pela concentração da enzima sem alterar o processo de gelificação. Em baixas concentrações de enzima (C_{enz}) o processo de gelificação torna-se muito lento, o que permitiu determinar a dependência de frequência das soluções XGJ mesmo nos estágios iniciais do processo de gelificação.

A FIGURA 24 mostra a dependência da frequência do G' e G'' para soluções de XGJ na concentração de 10 mg mL⁻¹ e com diferentes valores de t/t_g . As soluções de XGJ não tratadas com enzima formaram uma rede transitória e mostraram comportamento típico para soluções viscoelásticas como foi discutido em detalhes por Freitas e colaboradores (2015). Durante o tratamento enzimático, o tempo de relaxamento terminal da rede transitória tornou-se mais longo, mas o módulo de alta frequência permaneceu o mesmo. Isso significa que a densidade de reticulação da rede transitória permaneceu a mesma durante o tratamento enzimático, mas que o tempo de duração das reticulações transitórias aumentou. Além disso, um módulo de elasticidade independente de frequência (G_e), observado em baixas frequências, aumentou com o aumento da degalactosilação. O surgimento de um módulo de platô em baixa frequência implica que uma segunda rede foi formada com reticulações que

eram permanentes ou pelo menos tinham um tempo de duração maior (quasi-permanentes).

FIGURA 24 – G' (a) E G'' (b) EM FUNÇÃO DA FREQUÊNCIA ANGULAR PARA SOLUÇÕES DE XILOGLUCANA COM $M_w = 3,0 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$ EM $C = 10 \text{ mg mL}^{-1}$ OBTIDO EM DIFERENTES VALORES DE t/t_g INDICADOS NA FIGURA.



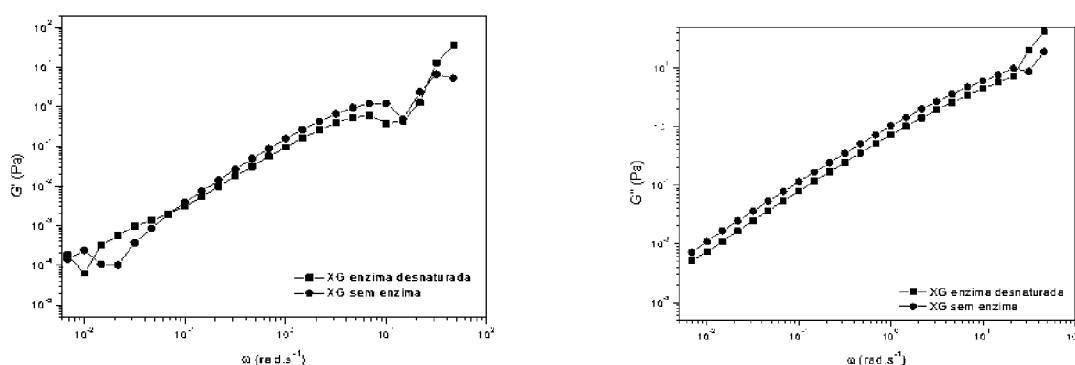
O valor de G_e aumentou com o aumento da degalactosilação. Na FIGURA 21b, a dependência do G_e é comparada com a de G' medida em função do tempo em $\omega = 1 \text{ rad s}^{-1}$ (pontos em vermelho no gráfico). Os resultados são os mesmos dentro do erro experimental, exceto quando o G_e é muito pequeno, onde a contribuição da rede transitória para G' em $\omega = 1 \text{ rad s}^{-1}$ ainda é significativa. Se a resposta à deformação mecânica for causada por elasticidade borrachosa, G_e corresponde ao número de cadeias elasticamente ativas (RUBINSTEIN; COLBY, 2003):

$$G_e \approx CRT/M_c \quad (9)$$

Onde, M_c é a massa molar média das seções de cadeia polimérica elasticamente ativas. No final do tratamento, G_e a $T = 50^\circ \text{C}$ foi de cerca de 20, 10^2 e $1,5 \times 10^3 \text{ Pa}$ para as concentrações de 5 mg mL^{-1} , 10 mg mL^{-1} e 20 mg mL^{-1} , respectivamente. Os valores correspondentes de M_c são $6,6 \times 10^5$, $2,7 \times 10^5$, $3,6 \times 10^4 \text{ g mol}^{-1}$, o que implica que o número de reticulações por cadeia de XGJ aumentou com o aumento da concentração do polímero.

Com a finalidade de excluir a possibilidade de que a simples presença da enzima na solução poderia estar, de alguma forma, interferindo nos resultados dinâmicos obtidos nos primeiros segundos, análises dinâmicas oscilatórias também foram realizadas com a XGJ sem e na presença da enzima desnaturada (FIGURA 25). A enzima foi previamente desnaturada através do aquecimento à temperatura constante em 80 °C, somente após o resfriamento ela foi utilizada no experimento. Observa-se que tanto o módulo elástico quanto o viscoso são similares, portanto, a rápida elevação do módulo elástico em baixa frequência deve-se estar associada à formação de redes permanentes ou quase permanentes e não pela influência da presença de partículas proteicas no meio.

FIGURA 25 – G' (a) e G'' (b) EM FUNÇÃO DA FREQUÊNCIA ANGULAR PARA SOLUÇÕES DE XILOGLUCANA SEM ENZIMA (-■-) E COM A ENZIMA PREVIAMENTE DESNATURADA (-●-) $C_{ENZ} = 16 \text{ U mL}^{-1}$.



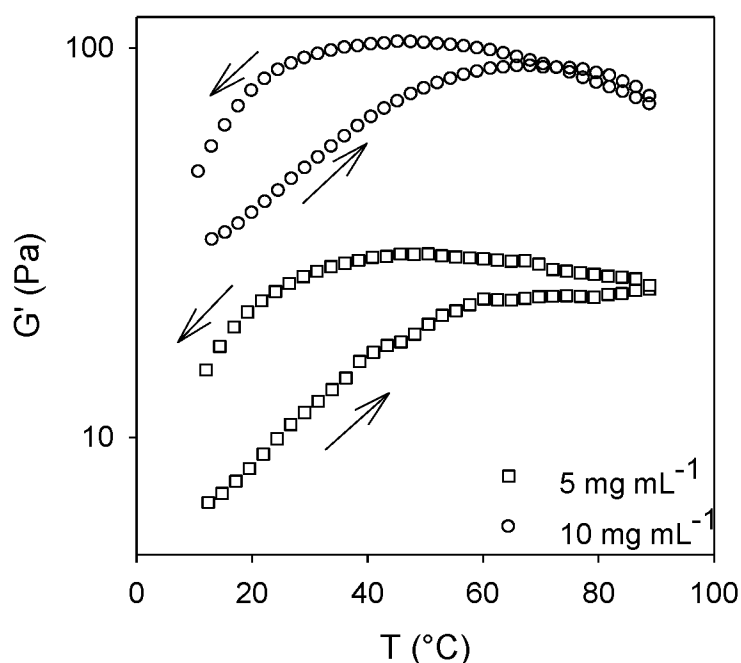
5.2 DEPENDÊNCIA DE TEMPERATURA DO MÓDULO DE ELASTICIDADE

No final do tratamento enzimático a 50 °C ($t/t_g \approx 87$), os géis foram submetidos a um ciclo de aquecimento e arrefecimento entre 10 °C e 90 °C. A FIGURA 26 mostra o módulo de elasticidade em função da temperatura para os géis nas concentrações de 5 mg mL⁻¹ e 10 mg mL⁻¹. O G_e aumentou com o aumento da temperatura até cerca de 60 °C, permaneceu constante entre as temperaturas de 60 a 80 °C e depois diminuiu um pouco quando aquecido até 90 °C. Durante o resfriamento subsequente, o G_e aumentou fracamente até cerca de 60 °C, manteve-se constante entre 60 a 30 °C e depois diminuiu abruptamente quando arrefecido até 10 °C. O comportamento

foi qualitativamente similar para as duas concentrações de XGJ. Pode-se observar uma histerese entre os ciclos de aquecimento e resfriamento.

Para o sistema investigado aqui, a ruptura das ligações durante o resfriamento não foi suficiente para “despercolar” a rede gelificada da XGJ e, portanto, os sistemas ainda formaram um gel a 10 °C. Brun-Graeppi e colaboradores (2010) observaram para a XG extraída das sementes de *Tamarindo indica* (XGT) que a gelificação da XGT tratada enzimaticamente foi reversível termicamente, o que implica que, para o sistema investigado por esses autores, ocorreu “despercolação”. O mesmo ocorreu no trabalho apresentado por Busato e colaboradores (2009), entretanto utilizando a XG oriunda das sementes de *H. courbaril*.

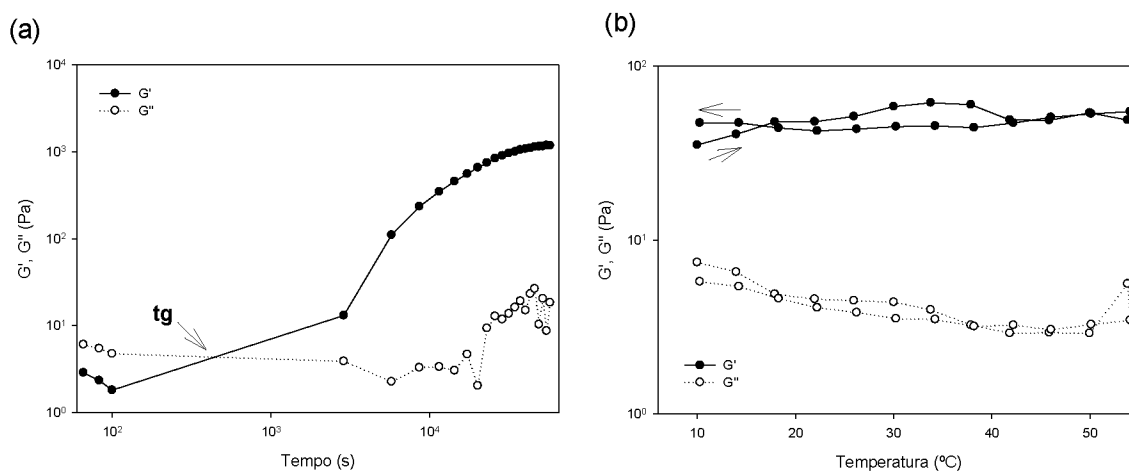
FIGURA 26 - MÓDULO ELÁSTICO DOS GÉIS FORMADOS POR XGJ, $M_w = 3,0 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$ A $C = 5 \text{ mg mL}^{-1}$ E 10 mg mL^{-1} APÓS TRATAMENTO ENZIMÁTICO A $t/t_g \approx 87$ DURANTE O AQUECIMENTO E SUBSEQUENTES CICLOS DE RESFRIAMENTO A UMA TAXA DE $0,5 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$.



Como não houve termo-reversão na XGJ tratada enzimaticamente com β -Gal, procurou-se avaliar outro parâmetro na reação de degalactosilação que poderia estar em desacordo com o que já foi tratado em literatura. Neste trabalho as reações enzimáticas ocorreram em pH 5,0, assim decidiu-se elevar o pH para 7,0 e avaliar se esta mudança poderia levar a XGJ tratada com β -gal a apresentar a característica de

termo-reversibilidade. Na FIGURA 27 estão apresentados os valores de G' e G'' ao longo do tempo e em diferentes temperaturas para a XGJ tratada enzimaticamente como já descrito anteriormente, entretanto em pH 7.

FIGURA 27 - (a) G' E G'' EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA XGJ ($M_W = 3,0 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$) NA CONCENTRAÇÃO DE 10 mg mL^{-1} , $C_{ENZ} = 16 \text{ U mL}^{-1}$ TEMPO DE REAÇÃO 16 HORAS E REAÇÃO EM pH 7,0. O TEMPO DE GELIFICAÇÃO (t_g) ESTÁ INDICADO NA FIGURA.
(b) RAMPA DE AQUECIMENTO E RESFRIAMENTO APÓS TRATAMENTO ENZIMÁTICO MOSTRADO, TAXA DE $0,5 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$.



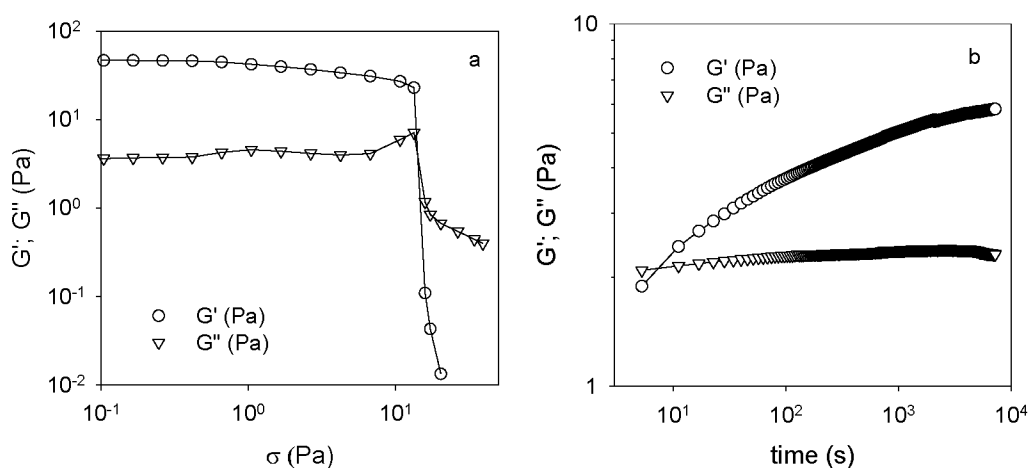
Observa-se que o tempo em que ocorre a gelificação (t_g) é distinto ao resultado apresentado na FIGURA 20, referente a reação que ocorreu em pH 5,0, entretanto semelhantemente à outra reação não houve a termo-reversão. Na FIGURA 27(b) é mostrado que o módulo elástico foi maior que o módulo viscoso em todas as temperaturas e que, em nenhum momento, houve a termo-reversão ou “despercolação” da rede gelificada formada. Estes dados indicam que não só o fato de a XG ser obtida de fontes diferentes pode induzir a resultados divergentes, mas também diferenças macromoleculares devido a forma da extração ou purificação podem levar à XG, obtida de uma mesma fonte, a possuir parâmetros reológicos diferentes. Dentre estes parâmetros escolhemos avaliar se a diferença na massa molar poderia estar envolvida nesta discordância dos resultados obtidos em literatura e os apresentados no trabalho. Esta discussão será apresentada posteriormente (item 5.4), onde será mostrado que há fusão dos géis durante o resfriamento quando a massa molar de XG extraída de *H. courbaril* é menor que $3.0 \times 10^6 \text{ g.mol}^{-1}$.

5.3 ESTRESSE E RECUPERAÇÃO DO RENDIMENTO

A tensão de ruptura dos géis de XGT a $C = 10 \text{ mg mL}^{-1}$ foi determinada executando uma rampa de tensão em $\omega = 1 \text{ rad s}^{-1}$. O módulo de armazenamento aparente começou a diminuir fracamente para $\sigma > 1 \text{ Pa}$ e caiu bruscamente em $\sigma > 10 \text{ Pa}$ indicando que o gel se rompeu, conforme apresentado na FIGURA 28a. Após a interrupção do cisalhamento, o sistema gelificou novamente e a elasticidade aumentou lentamente em função do tempo a $T = 50^\circ\text{C}$, ver FIGURA 28b. Isso significa que uma fração da reticulação foi reformada lentamente após a quebra. No entanto, G' permaneceu uma ordem de magnitude menor do que antes da ruptura indicando que a maioria das reticulações não foi reformada.

FIGURA 28 - a. MODOS DE CISALHAMENTO EM FUNÇÃO DO ESTRESSE DE OSCILAÇÃO EM $\omega = 1 \text{ rad s}^{-1}$ PARA O GEL DE XGJ COM $M_w = 3,0 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$ EM $C = 10 \text{ mg mL}^{-1}$ APÓS O TRATAMENTO ENZIMÁTICO ($t/t_g = 87$). O ESTRESSE FOI AUMENTADO A UMA TAXA DE $0,25 \text{ Pa POR SEGUNDO}$. XGJ TRATADA DURANTE $6 \times 10^4 \text{ s}$ COM $6,4 \text{ U mL}^{-1}$ DE $\beta\text{-gal}$.

b. RECUPERAÇÃO DOS MÓDULOS DE CISALHAMENTO COM O TEMPO APÓS A APLICAÇÃO DA RAMPA DE TENSÃO MOSTRADA NA FIGURA 28a.



A dependência de G' com a temperatura do gel quebrado após a recuperação parcial foi diferente da que ocorreu no gel original mostrando uma diminuição do G' com aumento da temperatura e menor histerese (FIGURA 29). As rampas de cisalhamento repetidas não mostraram uma diminuição adicional do G' após a cessação do fluxo, indicando que as rampas de cisalhamento subsequentes não causaram mais danos permanentes (FIGURA 30).

FIGURA 29 - COMPARAÇÃO DOS MÓDULOS DE CISALHAMENTO DE UM GEL DE XG ($M_w 3,0 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$) DURANTE CICLOS SUBSEQUENTES DE AQUECIMENTO E ARREFECIMENTO A UMA TAXA DE VELOCIDADE DE $0,5 \text{ } ^\circ\text{C min}^{-1}$. ANTES DO CORTE E DEPOIS DE SEREM SUBMETIDOS A UMA RAMPA DE TENSÃO, VER FIG. 28a. O GEL FOI FORMADO A $C = 10 \text{ mg mL}^{-1}$, APÓS TRATAMENTO ENZIMÁTICO EM $t/t_g = 87,3$, O GEL FOI DEIXADO RECUPERAR DURANTE 10^4 s A $50 \text{ } ^\circ\text{C}$.

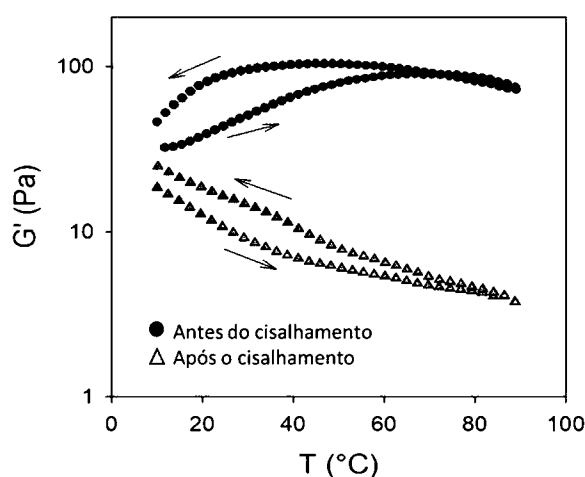
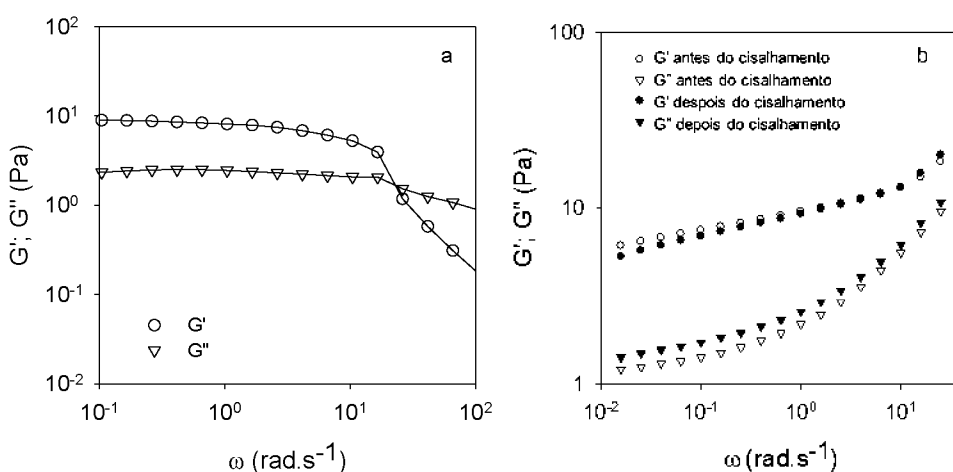


FIGURA 30 - a. MODOS DE CISALHAMENTO DE UM GEL DE XG ($M_w 3,0 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$) EM FUNÇÃO DA FREQUÊNCIA DE OSCILAÇÃO EM $\omega = 1 \text{ rad s}^{-1}$. O ESTRESSE FOI AUMENTADO A UMA TAXA DE $0,25 \text{ Pa por segundo}$. O GEL FOI FORMADO COM $C = 10 \text{ mg mL}^{-1}$, APÓS TRATAMENTO ENZIMÁTICO EM $t/t_g = 87,3$ E POSTERIORMENTE SUBMETIDO A UMA RAMPA DE TENSÃO, VER FIG. 28a. AS MEDIDAS FORAM FEITAS DEPOIS DE PERMITIR QUE OS GÉIS QUE SOFRERAM CISALHAMENTO SE RECUPERASSEM DURANTE 10^4 s A $50 \text{ } ^\circ\text{C}$

b. COMPARAÇÃO DOS MÓDULOS DE CISALHAMENTO DEPENDENTES DA FREQUÊNCIA DOS GÉIS DE XGJ PARCIALMENTE RECUPERADOS APÓS A PRIMEIRA E SEGUNDA RAMPAS DE CISALHAMENTO MOSTRADAS NAS FIGURAS 28a E 30a, RESPECTIVAMENTE



5.4 EFEITO DA MASSA MOLAR SOBRE A GELIFICAÇÃO TERMO-REVERSÍVEL

A termo-reversão da gelificação da xiloglucana de tamarindo do estado gel-sol, após reação enzimática com a β -Gal, já foi descrita em literatura por vários autores (BRUN-GRAEPPi et al., 2010; NISBET et al., 2006; SHIRAKAWA, YAMATOYA & NISHINARI, 1998). Entretanto, de acordo com os dados relatados até aqui, essa termo-reversão não foi observada para as amostras de XGJ. A hipótese levantada para este fenômeno está na diferença de massas molares entre as duas, visto que a XGJ possui M_w 30x maior que a de tamarindo. Por este motivo duas amostras de XGJ, com massas molares inferiores, foram produzidas por hidrólise enzimática da XGJ nativa com EG II, como descrito na seção de materiais e métodos.

A hidrólise enzimática com EG II tem como finalidade romper apenas as ligações α -glicosídicas (1 \rightarrow 4) da cadeia principal da xiloglucana levando à formação de cadeias menores. Dependendo do tempo de reação e da concentração enzimática pode levar a reação à formação de oligômeros com massas molares, viscosidade intrínseca e raio de giração muito menores, como foi observado no experimento realizado com monitoramento em tempo real por Spier e colaboradores (2015).

Os parâmetros macromoleculares das amostras de XGJ hidrolisadas foram determinados utilizando-se cromatografia de exclusão por tamanho e estão descritos na TABELA 3. Dentre essas amostras duas foram selecionadas para a realização das análises reológicas, a amostra com tempo de hidrólise de 30 min e a 20 h por ter uma massa molar semelhante à da xiloglucana de tamarindo.

TABELA 3 – PARÂMETROS MACROMOLECULARES DA XILOGLUCANA DE JATOBÁ NATIVA E HIDROLIZADAS ENZIMÁTICAMENTE COM EG II DURANTES 30 MIN E 20 HORAS.¹

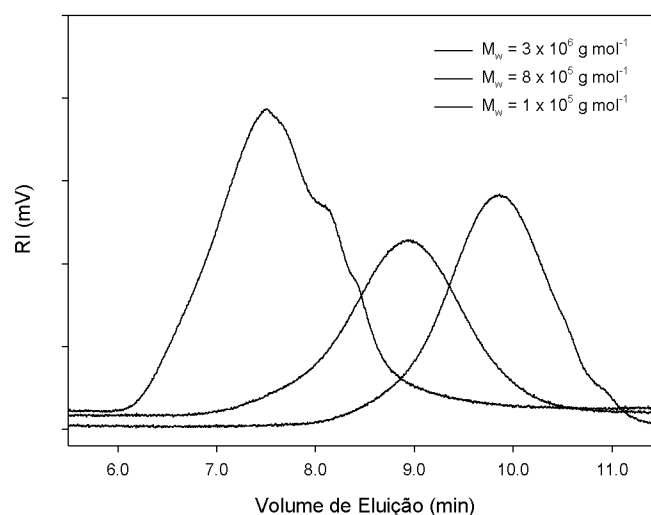
| | XGJ | 0,5h | 20h |
|--|--------------------|--------------------|-------------------|
| V_E (mL) | 7,5 | 8,9 | 9,8 |
| M_n (g mol⁻¹) | $2,13 \times 10^6$ | $1,01 \times 10^5$ | $2,1 \times 10^4$ |
| M_w (g mol⁻¹) | 3×10^6 | 8×10^5 | 1×10^5 |
| M_w/M_n | 1,4 | 7,3 | 4,4 |
| Recuperação | 86,3% | 86% | 65,2% |

¹ – por SEC Viscotek 270 Dual Detector, colunas SB-806M-HQ, fluxo 0,4 ml/min, a 40 °C

Como era de se esperar, moléculas menores eluem em volume de eluição maior, indicando uma diminuição do volume hidrodinâmico das amostras, ou seja,

quanto maior o tempo de hidrólise, menor o tamanho das moléculas de XGJ hidrolisadas. As distribuições da massa molar das duas frações selecionadas estão apresentadas na FIGURA 31 juntamente com a distribuição do M_w da nativa. A dispersão (D) destas aumentou de 1,4 da XGJ nativa para 7,3 da XGJ com 30 min hidrólise. Este valor de dispersão diminui ao longo do tempo da reação chegando a 4,4 para a amostra com 20 h de hidrólise, em função da quebra aleatória da cadeia polimérica gerada pela ação enzimática.

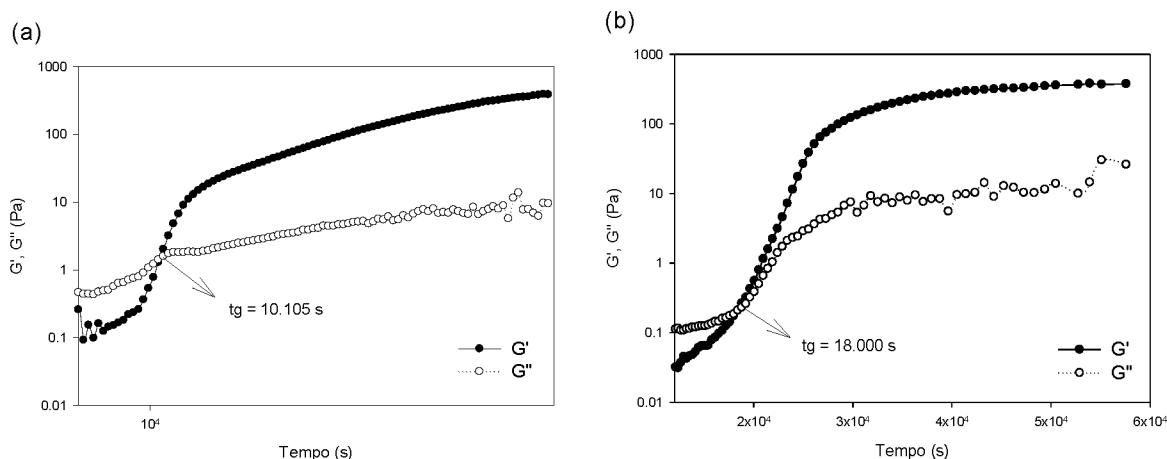
FIGURA 31 – PERFIL DE ELUIÇÃO DA CROMATOGRAFIA POR EXCLUSÃO DE TAMANHO (SEC) PARA A XILOGLUCANA E AS FRAÇÕES HIDROLISADAS COM TEMPO DE HIDRÓLISE XG 0,5h E 20 h.



5.4.1 Análises Dinâmicas Oscilatórias

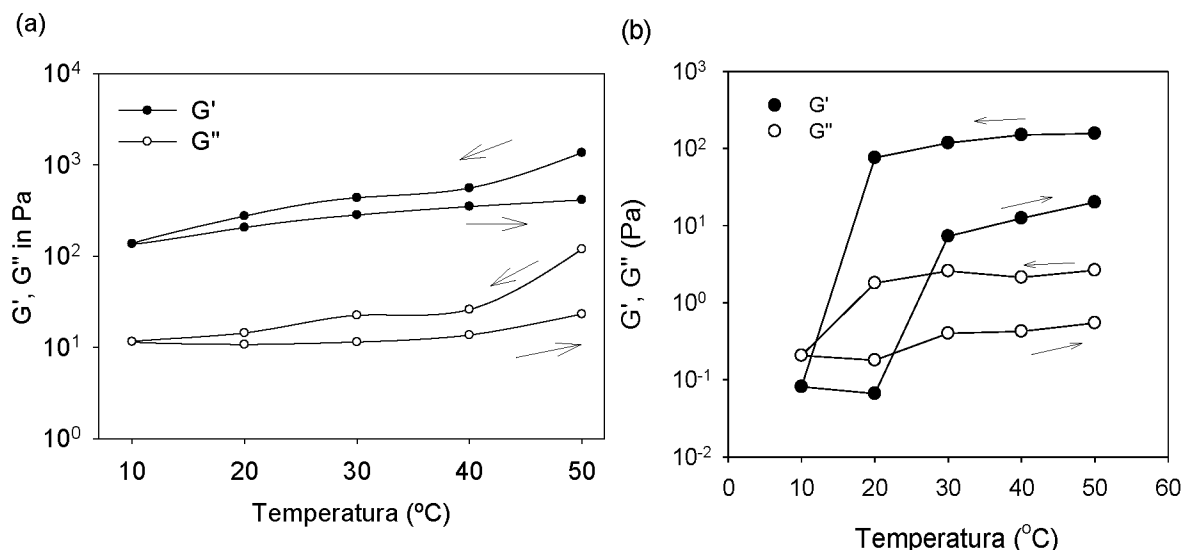
As análises dinâmicas oscilatórias das soluções de XGJ hidrolisadas em concentração de 10 mg mL^{-1} durante a reação enzimática de degalactosilação com $C_{ENZ} = 16 \text{ U mL}^{-1}$, a 50°C e 16 horas, mostraram que houve a formação da rede gelificada de uma forma semelhante ao XGJ $M_w = 3,0 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$ degalactosilado. Entretanto o tempo em que a gelificação ocorreu foi maior em comparação com a essa amostra nas mesmas condições. Quanto menor o M_w maior o tempo necessário para ocorrer a gelificação, entretanto os valores do módulo elástico ao final do experimento foram muito próximos para a ambas as amostras de XGJ hidrolisadas (FIGURA 32).

FIGURA 32 - G' E G'' EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA XGJ HIDROLISADA COM $M_w = 8,0 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$ (a) e $M_w = 1,0 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$ (b) NA CONCENTRAÇÃO DE 10 mg mL^{-1} E $C_{ENZ} = 16 \text{ U mL}^{-1}$, TEMPO DE REAÇÃO 16 HORAS. O TEMPO DE GELIFICAÇÃO ESTÁ INDICADO NA FIGURA (t_g).



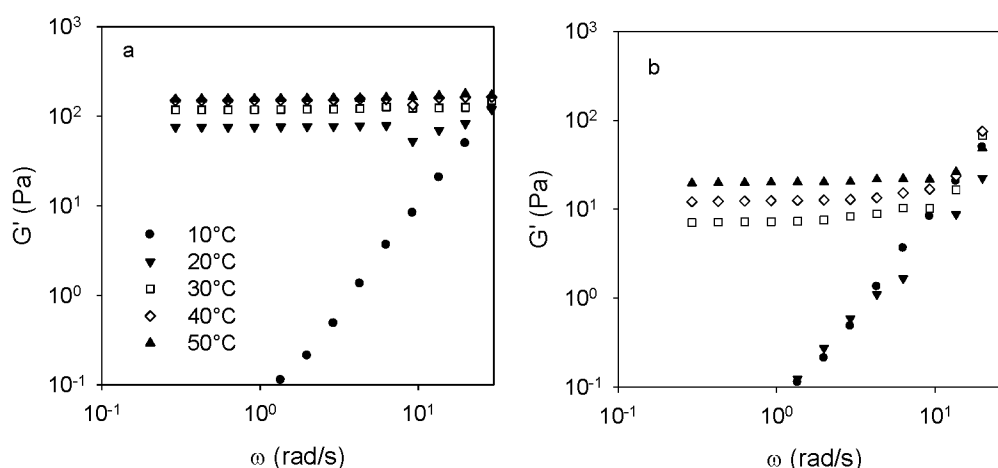
A FIGURA 33 mostra o módulo de cisalhamento $\omega = 6,23 \text{ rad s}^{-1}$ à diferentes temperaturas durante o arrefecimento de 50°C a 10°C e posterior aquecimento de a 50°C . Variou-se a temperatura a cada 10°C e foi deixada em equilíbrio durante 1 h antes de cada experimento a dada temperatura. Para a amostra de XGJ hidrolisada com $M_w = 8 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$ o arrefecimento até 10°C não causou a fusão do gel formado (FIGURA 1.14a). O que mostra que, para essa fração hidrolisada da XGJ com maior massa molar a dependência de temperatura é semelhante à da XGJ da Nativa com $M_w = 3,0 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$. No entanto, a rede gelificada formada com a XGJ com menor massa molar ($M_w = 1,0 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$), desfizeram-se quando foram arrefecidos a 10°C (FIGURA 1.14b). Esta rede gelificada “despercolou” entre 20°C e 10°C e foi reformada durante o aquecimento entre 20°C e 30°C . A reversibilidade térmica foi confirmada por medições da dependência da frequência em diferentes temperaturas durante o resfriamento e o aquecimento, que apresentaram um módulo de armazenamento independente de frequência a $T \geq 20^\circ\text{C}$ durante o resfriamento e $T \geq 30^\circ\text{C}$ durante o aquecimento subsequente (FIGURA 1.14b).

FIGURA 33 – (a) MÓDULO DE ARMAZENAMENTO EM $\omega = 6,23 \text{ rad s}^{-1}$ DO GEL DE XGJ EM DIFERENTES TEMPERATURAS DURANTE O RESFRIAMENTO DE 50 °C A 10 °C E SUBSEQUENTE AQUECIMENTO A 50 °C. O GÉL FOI FORMADO EM CONCENTRAÇÃO DE 10 mg mL⁻¹, ATRAVÉS DA REAÇÃO DE DEGALACTOSILAÇÃO DAS XGJ HIDROLISADAS COM $M_w = 8,0 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$. (b) GÉL FORMADO EM CONCENTRAÇÃO DE $C = 10 \text{ mg mL}^{-1}$, ATRAVÉS DA REAÇÃO DE DEGALACTOSILAÇÃO DA XGJ HIDROLISADA COM $M_w = 1,0 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$. MÓDULO DE ARMAZENAMENTO EM $\omega = 6,23 \text{ rad s}^{-1}$, RAMPA DE AQUECIMENTO DE 50 °C A 10 °C E RESFRIAMENTO ATÉ 50 °C.



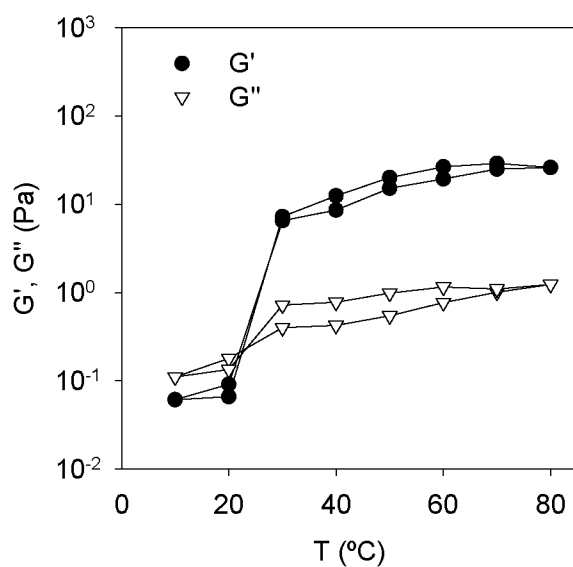
Como já foi mencionado acima, o número de reticulações diminui com a diminuição da temperatura para a amostra de XGJ hidrolisada com $M_w = 1,0 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$. Se a densidade de reticulação diminuir abaixo de um valor crítico, a rede de XGJ não percola mais, fazendo com que o gel funda. Parece que a redução da densidade de reticulação por arrefecimento para 10 °C foi suficiente para “despercolar” a rede XGJ se for formada com cadeias de XGJ com $M_w = 1,0 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$, mas não com $M_w = 8,0 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$ ou superior. Se a densidade de reticulação for muito maior do que o valor crítico, o comprimento da cadeia não tem mais influência significativa na elasticidade. Isto explica por que o G_e dos géis formados a 50 °C era independente da massa molar. No entanto, uma rede de percolação pode ser mantida com uma menor densidade de reticulação se as cadeias forem mais longas. Portanto, a densidade de reticulação crítica será alcançada durante o resfriamento à temperaturas mais baixas se M_w for maior ou a concentração de XGJ for maior. Para a XGJ estudada aqui, a temperatura crítica foi inferior a 10 °C a uma concentração de 10 mg mL⁻¹ para $M_w \geq 8,0 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$.

FIGURA 34 – (a) MÓDULO DE ARMAZENAMENTO EM $\omega = 6,23 \text{ rad s}^{-1}$ DO GEL DE XGJ EM DIFERENTES TEMPERATURAS DURANTE O RESFRIAMENTO DE 50°C A 10°C E SUBSEQUENTE AQUECIMENTO A 50°C . O GEL FOI FORMADO EM CONCENTRAÇÃO DE $C = 10 \text{ mg mL}^{-1}$, ATRAVÉS DA REAÇÃO DE DEGALACTOSILAÇÃO DA XGJ HIDROLISADA COM $M_w = 8,0 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$.
 (b) DEPENDÊNCIA DA FREQUÊNCIA DO MÓDULO DE ARMAZENAMENTO EM DIFERENTES TEMPERATURAS DURANTE O AQUECIMENTO À $C = 10 \text{ mg mL}^{-1}$, FORMADO POR DESGALACTOLIZAÇÃO DE XGJ HIDROLISADO SOB AQUECIMENTO COM $M_w = 1,0 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$.



A FIGURA 34 mostra que uma fração significativa das reticulações que foram quebradas durante o resfriamento não se reformou durante o aquecimento a 50°C . O aquecimento adicional a 80°C não aumentou muito a força do gel. Especula-se que, durante a rampa de resfriamento e aquecimento, uma fração de reticulações elasticamente efetivos foi transformada em reticulações elasticamente inativas. Isto pode ocorrer por formação de reticulações intra-cadeia ou pela formação de agregados de XGJ densamente reticulados no estado sol. Na verdade, Freitas e colaboradores (2011) relataram a formação de agregação após a degalactosilação em solução diluída. Curiosamente, se as rampas de aquecimento e arrefecimento forem repetidas, a histerese desapareceu, (FIGURA 35), sugerindo que a troca entre reticulações elasticamente ativos e inativos ocorreu principalmente durante a primeira rampa de resfriamento e aquecimento.

FIGURA 35 - MÓDULO DE ARMAZENAMENTO EM $\omega = 6,23 \text{ rad s}^{-1}$ DO GEL DE XGJ EM DIFERENTES TEMPERATURAS DURANTE O AQUECIMENTO DE 10 °C A 80 °C E SUBSEQUENTE ARREFECIMENTO A 10 °C. OS GÉIS FORAM FORMADOS EM $C = 10 \text{ mg mL}^{-1}$ POR DESGALACTOLIZAÇÃO DA XGJ HIDROLISADA COM $M_w = 1,0 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$. RAMPAS DE AQUECIMENTO E ARREFECIMENTO LOGO APÓS AS RAMPAS DE RESFRIAMENTO E AQUECIMENTO MOSTRADAS NA FIGURA 33b.



6 CONCLUSÃO

Soluções aquosas de XG nativa extraídas das sementes de *H. courbaril* formaram géis durante a degalactosilação a 50 °C induzida pela adição da enzima β -gal. A concentração da enzima influenciou a cinética de gelificação, mas não a rigidez do gel. O módulo de elasticidade dos géis aumentou com o aumento da concentração de XG entre cerca de 10 Pa à concentração de 5 mg mL⁻¹ e 10³ Pa à concentração de 20 mg mL⁻¹. A gelificação começou em graus muito baixos de degalactosilação (<10%) e chegou ao seu valor máximo com 65% de remoção da galactose. Entretanto, o módulo elástico continuou aumentando lentamente, sugerindo uma organização do sistema. O resfriamento causou o rompimento das reticulações, levando a uma diminuição do módulo de elasticidade dos géis, entretanto, se a densidade de ligações cruzadas estiver abaixo de um valor crítico, a rede XGJ “despercola” e há transição de fase gel-sol. A densidade de reticulação crítica para percolar cadeias de XGJ é maior se as cadeias forem mais longas, o que significa que a temperatura crítica na qual há a formação do gel é menor quando a massa molar de XGJ for maior. Para a XG extraída de *H. courbaril* com $M_w = 8,0 \times 10^5$ g mol⁻¹, a rede gelificada mantém-se mesmo a temperaturas 10 °C, mas com $M_w = 1,0 \times 10^5$ g mol⁻¹ houve reversão ao estado sol em temperatura baixas. A rede gelificada de XGJ foi quebrada quando um esforço de cisalhamento foi aplicado acima de um valor crítico, entretanto uma fração das ligações cruzadas quebradas é reformada ao longo de algumas horas.

CAPÍTULO 2

**GELIFICAÇÃO TÉRMICA DA XILOGLUCANA INDUZIDA
POR ADIÇÃO DE SAIS COSMOTRÓPICOS: ASPECTOS
CINÉTICOS E ESTRUTURAIS**

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

- Estudar a gelificação térmica da xiloglucana de jatobá (XGJ) induzida pela adição de ânions cosmotrópicos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter um hidrogel termo-sensível utilizando solução de XGJ com ânions sulfato em várias concentrações.
- Realizar análise reológica dinâmico-oscilatória da XGJ em misturas com ânions sulfato.
- Realizar análise reológica dinâmico-oscilatória da XGJ em misturas com outros ânions com caráter caotrópicos e cosmotrópicos presentes na série de Hofmeister.
- Caracterizar as misturas entre XGJ e ânions sulfato utilizando microscopia confocal a laser, em diferentes temperaturas.
- Caracterizar termicamente estes materiais utilizando microcalorímetro diferencial de varredura.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

A xiloglucana foi extraída a partir das sementes de jatobá (*Hymenaea courbaril*), provenientes de Cuiabá, no estado de Mato Grosso do Sul, e doados pela EMBRAPA CERRADOS. Resumidamente, as sementes de jatobá foram moídas, despigmentadas e deslipidificadas sobre refluxo com éter etílico em sistema *Soxhlet*. O isolamento da XG foi realizado através de extração aquosa exaustiva em *blender*, seguido de filtração em pano de *nylon*, centrifugação a $10^4 g$, 40 °C por 30 min, e precipitação com concentrações crescentes de etanol de 70% a 100%, para posterior secagem a vácuo a 40°C (FREITAS et al., 2015).

4.2 PURIFICAÇÃO DA XILOGLUCANA

Uma quantidade de 40g da XG foi solubilizada em 1L de água, sob agitação constante por 24h. Após este período a dispersão foi centrifugada a $10^4 g$ por 30 min a temperatura de 40 °C. O sobrenadante foi recolhido e precipitado com 2 volumes de etanol em seguida o precipitado foi lavado com etanol 99% e posteriormente com acetona 99%. O precipitado foi acondicionado em estufa a 40 °C até a secagem, e armazenado ao abrigo da umidade. A amostra de xiloglucana será doravante denominada de XGJ.

4.3 PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE XILOGLUCANA COM SULFATO DE SÓDIO

A amostra de XGJ nativa foi dispersa sob agitação durante a noite em água ultrapura (MilliQ systems) a uma concentração de 1 mg mL^{-1} contendo 200 ppm de azida de sódio (NaN_3) como conservante. Após, adicionou-se Na_2SO_4 (F. Maia, 99,0%) à dispersão de XGJ mantida sob agitação, em concentrações finais de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, $0,65 \text{ mol L}^{-1}$, $0,75 \text{ mol L}^{-1}$ e 1 mol L^{-1} . As misturas entre XGJ e

Na₂SO₄ foram deixadas em agitação durante 12 horas antes de serem submetidas à análise.

4.4 PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE XILOGLUCANA COM OUTROS SAIS COSMOTRÓPICOS

A amostra de XGJ nativa foi dispersa sob agitação durante a noite em água ultrapura (MilliQ systems) a uma concentração de 1 mg mL⁻¹ contendo 200 ppm de azida de sódio (NaN₃) como conservante. Após, adicionou-se Na₂HPO₄ (fosfato de sódio dibásico), NaCl (cloreto de sódio), NaH₂PO₄ (fosfato de sódio monobásico) e NaNO₃ (nitrato de sódio) à dispersão de XGJ mantida sob agitação, a concentração de 1 mol L⁻¹. As misturas entre XGJ e sais cosmotrópicos foram deixadas em agitação durante 12 horas antes de serem submetidas à análise.

4.5 ANÁLISES REOLÓGICAS

As análises dinâmicas oscilatórias foram realizadas utilizando um sistema Thermo Scientific Haake Rheostress 1 (Karlsruhe, Alemanha), equipado com geometrias de cone e placa (35 mm de diâmetro, 2°). Os módulos de cisalhamento elástico (G') e viscoso (G'') foram medidos em uma frequência angular de 1 rad s⁻¹. O estresse imposto foi escolhido dentro do regime de resposta linear ($\sigma = 1$ Pa). As medidas de cisalhamento oscilatório foram realizadas em várias temperaturas de 10 °C a 50 °C, em passos de 10 °C. A solução a ser analisada foi vertida na placa do instrumento, a qual estava à temperatura de 10 °C, e posteriormente aquecida até 50 °C, na qual permaneceu durante 16 h antes das medições reológicas (fase lag). Para evitar evaporação, a lateral do cone-placa foi coberta com uma camada de óleo mineral para evitar evaporação.

4.6 ANÁLISE DE MICROSCOPIA CONFOCAL DE VARREDURA A LASER

A XGJ foi marcada com isotiocianato de rodamina (RITC), um corante fluorescente, para detecção em microscópio de fluorescência e confocal a laser (MFCL). A reação ocorreu segundo Belder e Granath (1973), em que o polissacarídeo (50 mg) foi disperso em 10 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), contendo duas gotas de piridina. Após dispersão do polímero no solvente, foi adicionado 2 mg do RITC a mistura, juntamente com 20 mg do catalisador dibutil dilaurato de estanho. A reação ocorreu durante 2h a 95 °C. Posteriormente, a XGJ-RITC foi precipitada com etanol 99%, e lavada exaustivamente até que o filtrado não apresentasse coloração. O precipitado ainda foi lavado com acetona e seco em estufa, ao abrigo da luz, a 35 °C.

As imagens foram produzidas em um microscópio confocal Nikon A1RSiMP (Tóquio, Japão), usando lentes imersas em água e óleo (20X e 60X com aberturas numéricas de 0,75 e 1,4, respectivamente, e 60X com zoom ótico de 4X). Para o GFP foi utilizado laser 488 nm para excitação e filtro de intervalo ("band pass") de 500-550 nm e para o DAPI foi utilizado laser 405 nm para excitação e filtro de intervalo ("band pass") de 425 - 475 nm. As amostras foram preparadas utilizando uma mistura de XGJ-RITC a 0,1% e XGJ 0,9% (m/m) solubilizadas em água ultrapura (sistema Milli-Q) durante 12 h.

4.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

A XGJ com Na_2SO_4 foi preparada de acordo com o descrito na seção 4.3, colocada em estufa a 50 °C e deixada durante 16 h. Após este período o gel formado foi congelado utilizando nitrogênio líquido e colocado no liofilizador por 12h. As amostras foram coladas no suporte para MEV Tescan, com uma fita dupla face de cobre e metalizadas com ouro. As análises de microscopia foram efetuadas no Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da Universidade Federal do Paraná (UFPR), utilizando-se o Microscópio Eletrônico de Varredura TESCAN VEGA3 LMU. Os ensaios foram executados com aspectos tridimensionais por estereoscopia de elétrons secundários processadas pelo programa Mex da Alicona e com magnificação de 5 kX, 20 kX e 50 kX.

4.8 ESPECTROSCOPIA DE ENERGIA DISPERSIVA

A XGJ com Na_2SO_4 foi preparada de acordo com o descrito na seção 4.3, colocada em estufa a 50 °C e deixada durante 16 h. Após este período o gel formado foi congelado utilizando-se nitrogênio líquido e colocado no liofilizador por 12h. As amostras foram coladas no suporte para MEV Tescan, com uma fita dupla face de cobre apenas, não houve metalização. As análises de espectroscopia de energia dispersiva (EDS) foram realizadas no centro de Microscopia Eletrônica (CME) da Universidade Federal do Paraná (UFPR), utilizando-se o Microscópio Eletrônico de Varredura TESCAN VEGA3 LMU.

4.9 MEDIÇÕES DE MICROCALORIMETRIA DE VARREDURA DIFERENCIAL

Os experimentos foram realizados em um microcalorímetro de varredura diferencial, DSC III (Setaram Ltd., França) sob fluxo de N_2 ultrapuro (1 bar) utilizando vasos de 1 cm^3 . As taxas de aquecimento e arrefecimento foram de 0,2 °C min^{-1} e o intervalo de temperatura foi de 5 a 90 °C. A solução da amostra e a água deionizada (sistema Milli-Q) utilizada como referência (850 mg cada) foram seladas hermeticamente. As análises foram realizadas no Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Os dados foram coletados utilizando o software Setsoft 2000.

4.10 DICROÍSMO CIRCULAR

Os espectros de dicróismo circular (CD) foram obtidos utilizando-se o equipamento da Jasco J-815 espectropolarímetro (Jasco Instruments, Japão). A faixa de varredura registrada foi de 195-250 nm (medido em milionésimos (mdeg)), com velocidade de escaneamento de 20 nm min^{-1} , sensibilidade alta e 2 acumulações. Durante as análises ao sistema inteiro, incluindo a câmara de amostra, foi acrescentado N_2 gasoso. A cubeta de quartzo utilizada foi de 1 mm e as amostras de XGJ com concentração de 1 mg mL^{-1} a essas amostras foram acrescentadas o Na_2SO_4 nas concentrações finais de 0,5 e 1 mol L^{-1} . A faixa de temperatura utilizada foi de 10-50 °C com taxa de aquecimento de 1 °C min^{-1} e aquisição a cada 5 °C.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 EFEITO DO SULFATO DE SÓDIO NA GELIFICAÇÃO DA XILOGLUCANA

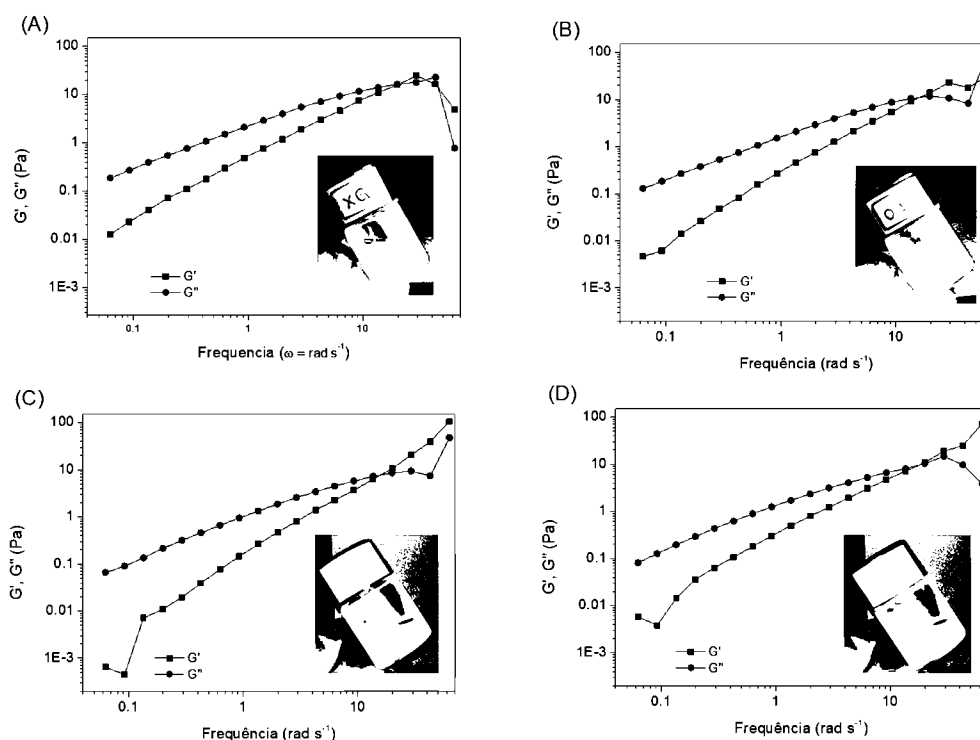
Como já foi comentado na revisão bibliográfica, a série Hofmeister está ordenada de acordo com a capacidade de solubilizar ou agregar macromoléculas e esta característica está relacionada à capacidade do ânion ou cátion de ordenar as moléculas de água ao seu redor (KUNZ; HENLE; NINHAM, 2004). Devido a isso, alguns íons podem acabar removendo a água de solvatação presente na macromolécula promovendo uma maior interação intra e intermolecular. Dentre os sais cosmotrópicos o sulfato de sódio foi escolhido por apresentar baixa toxicidade e devido ao fato de o ânion sulfato apresentar caráter fortemente cosmotrópico.

A adição do sulfato de sódio à solução aquosa de XGJ foi avaliada, a fim de observar se é possível gerar uma maior interação entre as cadeias do polímero e, portanto, gerar redes poliméricas permanentes (definidas aqui como redes poliméricas com um tempo de relaxamento com valor muito elevado ou seja, permanentes) ou alterar as redes transientes (definidas aqui como redes transitórias devido ao entrelaçamento das cadeias poliméricas, e com baixo tempo de relaxamento) já presentes em sistemas semi-diluídos, levando à formação do gel.

Inicialmente, uma quantidade de Na_2SO_4 foi adicionado à solução aquosa de XGJ e observou-se visualmente se a transição sol-gel ocorria quando esta foi exposta a uma temperatura de 50 °C durante 1 hora e arrefecida a 10 °C como mostrado na FIGURA 36 e 37. Após a análise visual, testes reológicos dinâmicos oscilatórios foram realizados com estas mesmas amostras para comprovar a formação e a reversão da gelificação.

Na FIGURA 36 observa-se que, considerando as fotos e os dados reológicos, todas as amostras a 10 °C possuem um aspecto similar, característico de uma solução viscoelástica. Entretanto na FIGURA 37 observa-se a formação de um gel, a 50 °C, para amostras de XGJ contendo Na_2SO_4 a 1,0 mol L⁻¹ e isto é possível distinguir quando se compara a imagem desta amostra com as outras as quais são menos turvas, com aparência mais translúcida. Estes dados são confirmados com os testes reológicos oscilatórios, também a 50 °C, o qual mostrou um aumento significativo no módulo elástico (G') na região correspondente à rede permanente ou quase-permanente.

FIGURA 36 - G' (-●-) E G'' (-■-) EM FUNÇÃO DA FREQUÊNCIA ANGULAR E FOTOS DA XGJ NATIVA 10 mg mL⁻¹ (A), E COM Na₂SO₄ NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 mol L⁻¹ (B), 0,5 mol L⁻¹ (C) E 1 mol L⁻¹ (D) A TEMPERATURA DE 10 °C.

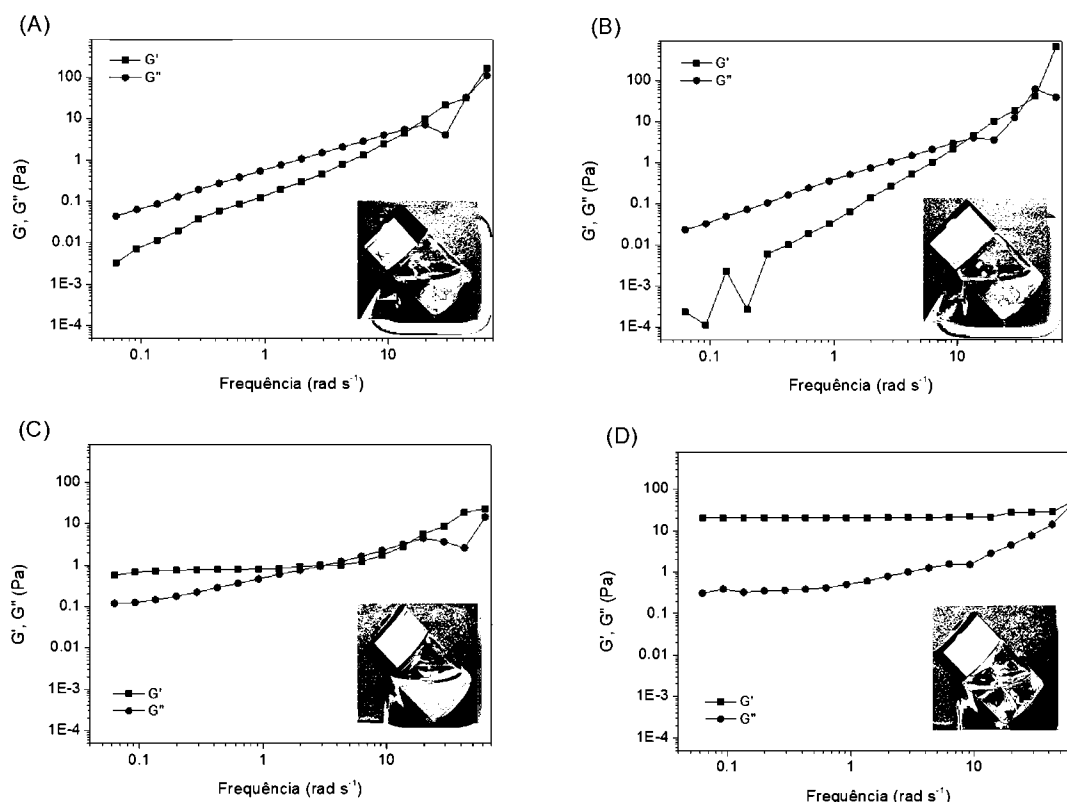


Para a amostra de XGJ contendo Na₂SO₄ a 0,1 mol L⁻¹ houve uma queda na viscosidade, após 1 hora de aquecimento, e macroscopicamente, não foi observada a formação de gel. Para a amostra de XGJ com 0,5 mol L⁻¹ de Na₂SO₄ há um aumento discreto na turbidez do material, a qual pode estar relacionada ao aumento do componente elástico da amostra, ou seja, houve um aumento nas redes permanentes. A maior turvação e aspecto de gel foi observado para a amostra de XGJ contendo 1,0 mol L⁻¹ de Na₂SO₄.

A partir desses dados observou-se que o módulo elástico (G') e o módulo viscoso (G'') foram afetados com o aumento da concentração do sal cosmotrópico na solução de XGJ. Em altas concentrações de Na₂SO₄ e altas temperaturas, ocorreu o favorecimento das interações intermoleculares, possivelmente oriundas das partes hidrofóbicas, entre as cadeias poliméricas levando ao aumento do módulo de armazenamento (G'). Enquanto em baixas concentrações de Na₂SO₄ e em temperaturas altas, houve uma diminuição nos valores dos módulos elástico (G') e viscoso (G'') em comparação com a amostra de XGJ nativa. Provavelmente, houve um decréscimo parcial da solubilidade do polissacarídeo, com parcial separação de

fases, o que pode ter reduzido a concentração da XGJ na solução, mas não o suficiente para induzir uma gelificação, observada apenas em maiores concentrações de ânion sulfato, reduzindo assim os módulos elásticos e viscosos.

FIGURA 37 - G' (-●-) E G'' (-■-) EM FUNÇÃO DA FREQUÊNCIA ANGULAR E FOTOS DA XGJ NATIVA 10 mg mL^{-1} (A), E COM Na_2SO_4 NAS CONCENTRAÇÕES DE $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (B), $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ (C) E 1 mol L^{-1} (D) À TEMPERATURA DE 50°C .



Novos testes dinâmicos oscilatórios foram realizados, entretanto agora ao longo do tempo a temperatura constante de 50°C , os quais demonstraram que a quantidade de sal adicionada ao sistema influencia também na cinética de formação do gel, assim como nos valores dos módulos de cisalhamento obtidos, para uma mesma concentração polimérica. Nestes testes a amostra de XGJ com Na_2SO_4 foi arrefecida e colocada no reômetro à temperatura de 10°C , após iniciou-se uma rampa de aquecimento com duração de 0,5 h até chegar à temperatura constante de 50°C , em que as dispersões foram mantidas por 16 horas. Durante estas análises, os módulos de armazenamento (G') e perda (G'') foram mensurados continuamente pelo

tempo como mostrado na FIGURA 38. O tempo de gelificação (t_g), o qual se definiu como sendo o tempo em que os módulos de cisalhamento são iguais ($G' = G''$), foram diferentes para cada XGJ que foi tratada com distintas concentrações de sal. Para a amostra com concentração de $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de Na_2SO_4 ocorreu no tempo de 24.800 s, enquanto que para a amostra com maior concentração a transição do estado sol-gel ocorreu próximo de chegar a temperatura de 50°C , em torno de 1.660 s.

Os ensaios reológicos evidenciaram também a diferença nos valores de G' , indicando que na maior concentração de sal cosmotrópico há uma maior interação hidrofóbica entre as cadeias levando à formação de uma rede polimérica mais densa. Isso mostra que, quanto maior a concentração de sal adicionado, maior a característica elástica da rede gelificada formada, levando também a uma diminuição no tempo necessário para que a gelificação ocorra, ou seja, há uma relação inversa com t_g .

Apesar do número ainda limitado de pontos relacionando $1/t_g$ com a concentração de Na_2SO_4 , observou-se que há uma relação linear entre $1/t_g$ e a concentração de sal cosmotrópico (FIGURA 39), indicando que, possivelmente, apenas um aspecto cinético diferencia os experimentos com a mesma concentração de polissacarídeo e aumento da concentração de Na_2SO_4 . Para confirmar que há apenas um aspecto cinético envolvido, foram construídas curvas mestres de G' em função da t/t_g (dados não mostrados), e concluiu-se que, mesmo existindo um parâmetro cinético envolvido na formação das redes de XGT com sais cosmotrópicos, os módulos de cisalhamento observados não se sobrepõem, e apresentam dependência dos módulos da concentração de Na_2SO_4 . Assim, fica evidente que a concentração dos sais aqui testados afeta a cinética da gelificação, e adicionalmente influenciam a quantidade de moléculas que fazem parte da rede permanente formada.

FIGURA 38 - G' E G'' COMO FUNÇÃO DO TEMPO PARA XGJ 10 mg mL^{-1} CONTENDO Na_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ (A); $0,65 \text{ mol L}^{-1}$ (B), $0,75 \text{ mol L}^{-1}$ (C) E 1 mol L^{-1} (D) EM VELOCIDADE ANGULAR DE $\omega = 6,28 \text{ rad s}^{-1}$ A 50°C .

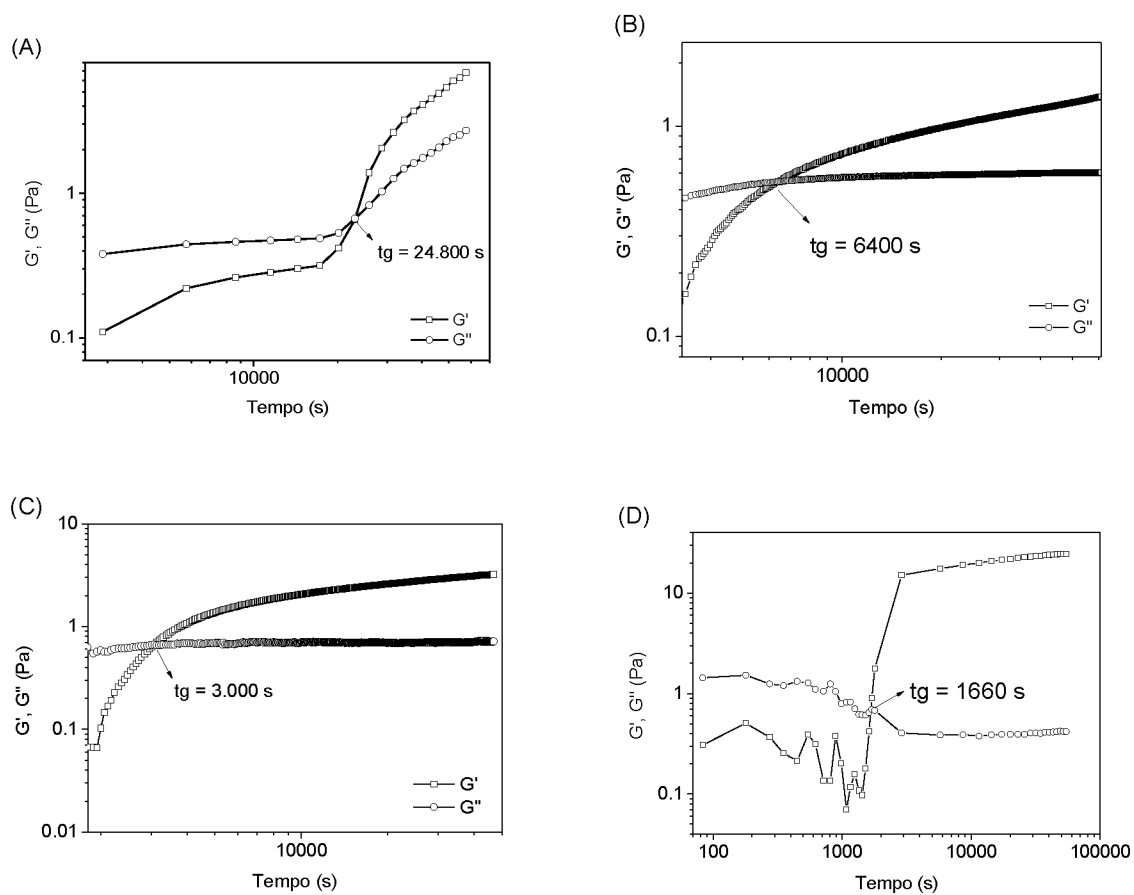
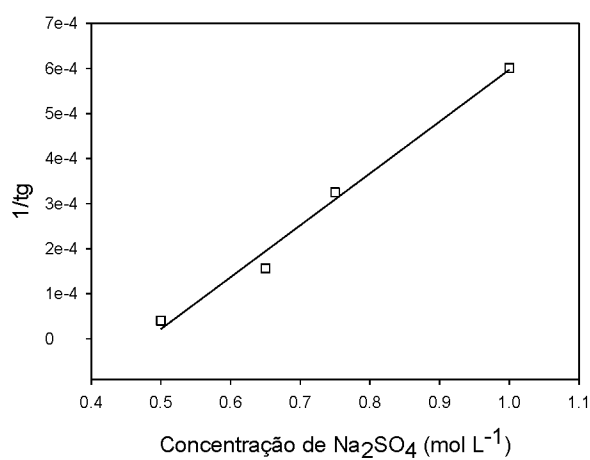


FIGURA 39 - DEPENDÊNCIA DE $1/t_g$ EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE Na_2SO_4 .



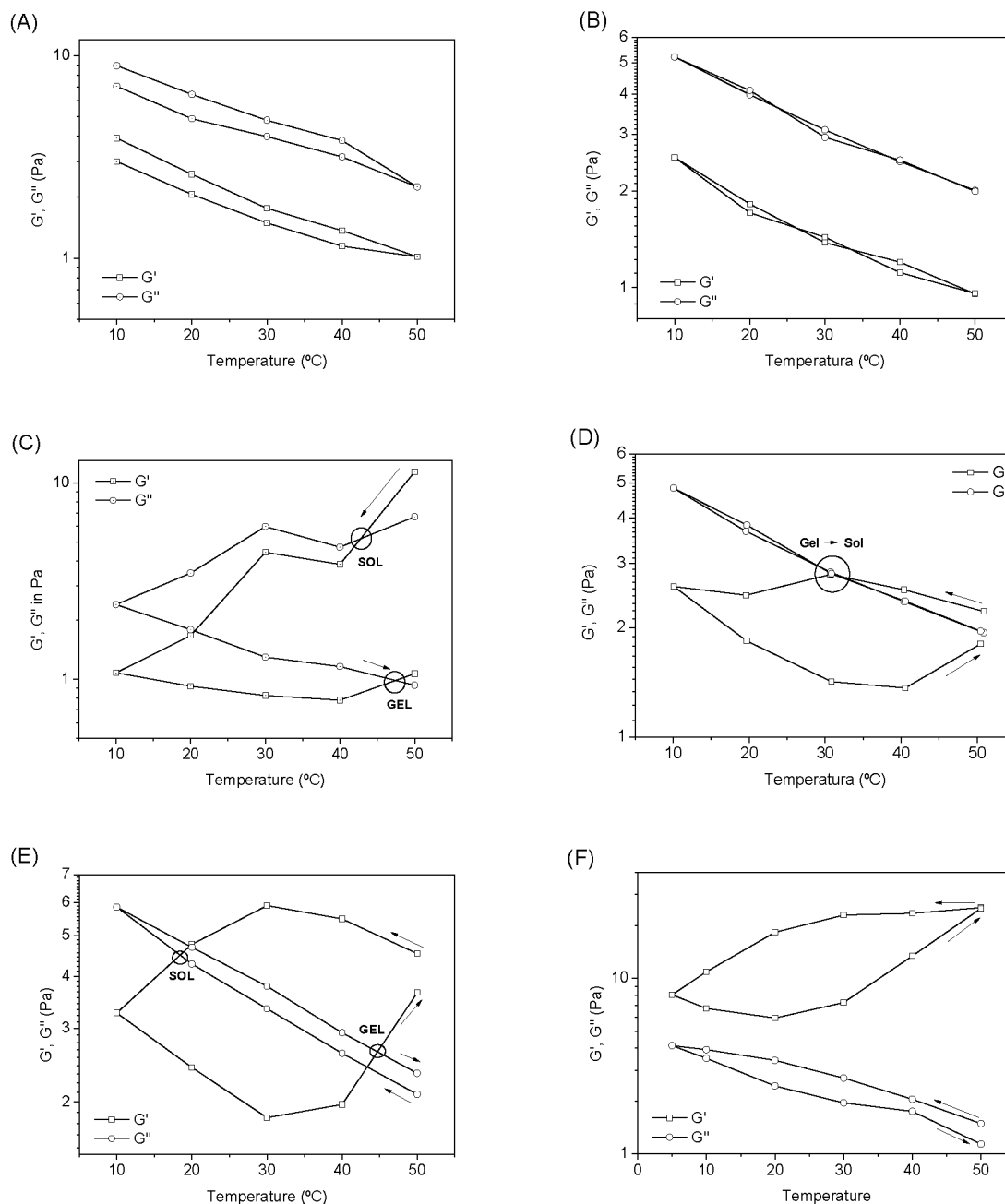
Após as amostras permanecerem no reômetro sendo monitoradas durante 16 horas a temperatura de 50 °C (FIGURA 38) os módulos de cisalhamento G' e G'' a $\omega = 6,28 \text{ rad s}^{-1}$ foram mensurados em diferentes temperaturas durante o arrefecimento de 50 °C a 10 °C e posterior aquecimento a 50 °C (FIGURA 40). A rampa de temperatura foi construída a cada 10 °C, na qual a amostra permaneceu por pelo menos 1,5 horas antes das análises dinâmicas oscilatórias serem realizadas.

A concentração de Na_2SO_4 de 0,1 mol L⁻¹ e 0,25 mol L⁻¹ não mostrou efeitos significativos até 50 °C sobre os módulos de cisalhamento, essas concentrações de sal não foram suficientes para induzir a interação entre as cadeias de XGJ em nenhuma temperatura. A queda, em altas temperaturas, nos módulos viscoelásticos em ambas as concentrações indicam que na temperatura de 50 °C, há uma perda parcial de solubilidade, mas sem formação de gel.

A amostra de XGJ com Na_2SO_4 a 0,5 mol L⁻¹ exibiu características de gel, mas, após o resfriamento, houve a despercolação desta rede a qual foi reformada após o aquecimento, porém este gel formado era 5 vezes mais fraco que o inicial. O mesmo aconteceu para as XGJ com Na_2SO_4 a 0,65 mol L⁻¹ e 0,75 mol L⁻¹, contudo a rede gelificada reformada para essas amostras teve uma característica semelhante à inicialmente formada. Apenas a XGJ com Na_2SO_4 a 1 mol L⁻¹ não apresentou termo-reversibilidade.

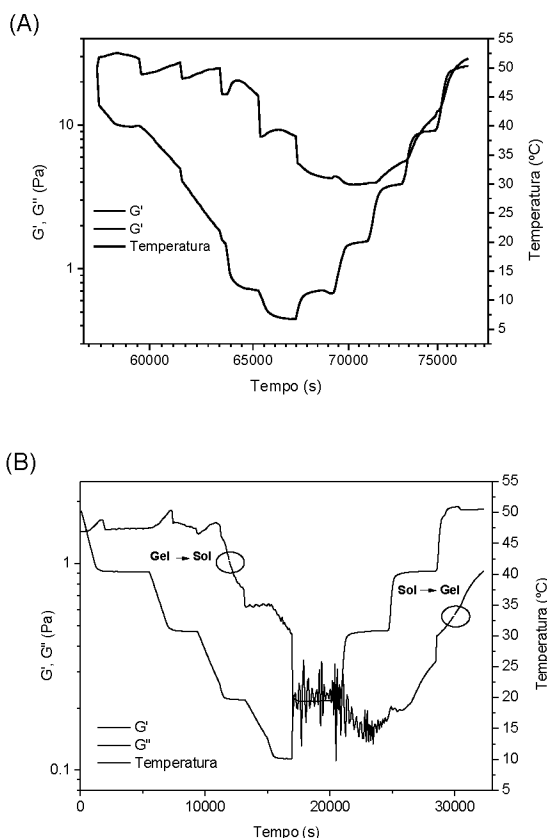
Dentre as amostras as únicas que apresentaram o efeito termo-reversível foram a XGJ com concentração de Na_2SO_4 a 0,75 mol L⁻¹, 0,65 mol L⁻¹ e 0,5 mol L⁻¹. Conforme mostrado na FIGURA 40, o estado GEL-SOL ocorre a temperaturas de 18 °C, 30 °C e 42 °C, respectivamente, para as amostras de XGJ com Na_2SO_4 a 0,75 mol L⁻¹, 0,65 mol L⁻¹ e 0,5 mol L⁻¹. A transição do estado SOL-GEL ocorre a temperatura similar para ambas as concentrações de Na_2SO_4 de 0,75 mol L⁻¹ e 0,5 mol L⁻¹, 44 °C e 47 °C, porém a XGJ com Na_2SO_4 a 0,65 mol L⁻¹ não apresentou a reversão para o estado gel.

FIGURA 40 - MÓDULO DE ARMAZENAMENTO (-□-) E PERDA (-○-) EM $\omega = 6,28 \text{ rad.s}^{-1}$ DE XGJ A 10 mg mL^{-1} EM Na_2SO_4 A $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (A); $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ (B); $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ (C), $0,65 \text{ mol L}^{-1}$ (D), $0,75 \text{ mol L}^{-1}$ (E) e 1 mol L^{-1} (F) EM DIFERENTES TEMPERATURAS DURANTE O ARREFECIMENTO DE 50°C A 10°C E SUBSEQUENTE AQUECIMENTO A 50°C . AS AMOSTRAS FORAM MANTIDAS A $1,5 \text{ h}$ EM CADA TEMPERATURA, ANTES DE DETERMINAR OS MÓDULOS DE CISLHAMENTO.



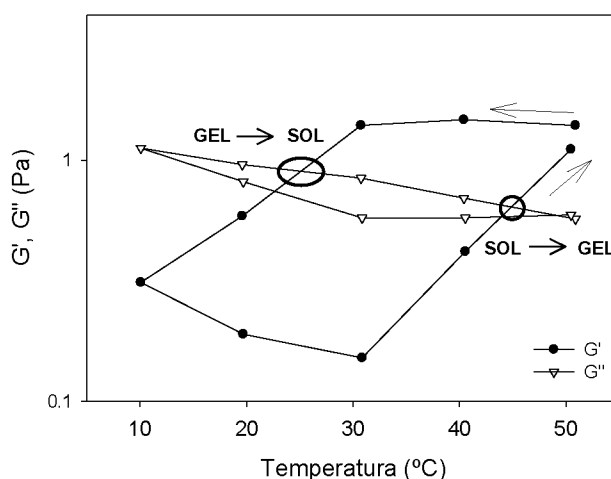
Aplicando-se diferentes tempos de aquecimento a 50 °C antes das análises reológicas, foi observado que com 1 h de aquecimento há termo-reversibilidade do gel (FIGURA 36 e 37) para todas as concentrações de sal adicionado. Entretanto, quando a amostra de XGJ com Na_2SO_4 a 1 mol L^{-1} permaneceu por mais tempo em aquecimento (16h), não houve termo-reversão. Assim, a cinética de agregação e desagregação são afetadas também pelo histórico térmico do aquecimento da amostra e não apenas pela concentração do sal. Em outras palavras, quanto maior o tempo a uma dada temperatura, maior o tempo necessário para que a desagregação seja observada, chegando a tempos consideravelmente elevados, após 16 h de aquecimento a 50 °C. Na figura FIGURA 41A, observa-se que para a amostra com maior concentração de sal houve uma queda dos módulos de armazenamento, mas não o suficiente para que houvesse a despercolação do gel, como ocorreu com a amostra com menor concentração, FIGURA 41B.

FIGURA 41 - G' (LINHA PRETA) E G'' (LINHA CINZA) PELO TEMPO (s), $\omega = 1,0 \text{ rad s}^{-1}$ DURANTE RESFRIAMENTO DE 50 °C ATÉ 10 °C E POSTERIOR AQUECIMENTO ATÉ 50 °C (LINHA AZUL) PARA AS AMOSTRAS DE XGJ COM Na_2SO_4 A 1 mol L^{-1} (A) E 0,65 mol L^{-1} (B). DADOS OBTIDOS APÓS FASE LAG DE 16 HORAS. A RAMPA FOI CONSTRUÍDA COM A AMOSTRA PERMANECENDO DURANTE 1,5 HORA A UMA DADA TEMPERATURA E SEBSEGUENTE ABAIXAMENTO A CADA PASSO DE 10 °C.



Na FIGURA 41B, cujos dados foram obtidos através do acompanhamento do módulo elástico e viscoso pelo tempo com frequência angular de $\omega = 1,0 \text{ rad s}^{-1}$, observa-se a transição do estado sol-gel, da XGJ com Na_2SO_4 a $0,65 \text{ mol L}^{-1}$. Entretanto, isto não é observado nos gráficos de rampa de temperatura (FIGURA 40), os quais foram obtidos a frequência angular de $\omega = 6,28 \text{ rad s}^{-1}$. As regiões em baixa frequência correspondem as redes permanentes do gel, enquanto regiões de alta frequência correspondem as redes transientes associadas aos entrelaçamentos poliméricos. Conclui-se com isso que para as outras concentrações o tempo de relaxamento terminal da rede transitória é mais longo, enquanto para esta é menor. Na FIGURA 42, a rampa de temperatura para a amostra de XGJ com Na_2SO_4 a $0,65 \text{ mol L}^{-1}$, foi obtida, contudo a partir de valores de frequência angular menor que a rampa apresentada na FIGURA 40D. Podemos observar que a transição Gel-Sol ocorre a temperatura de 25°C , enquanto que a transição Sol-Gel ocorreu a temperatura de 44°C .

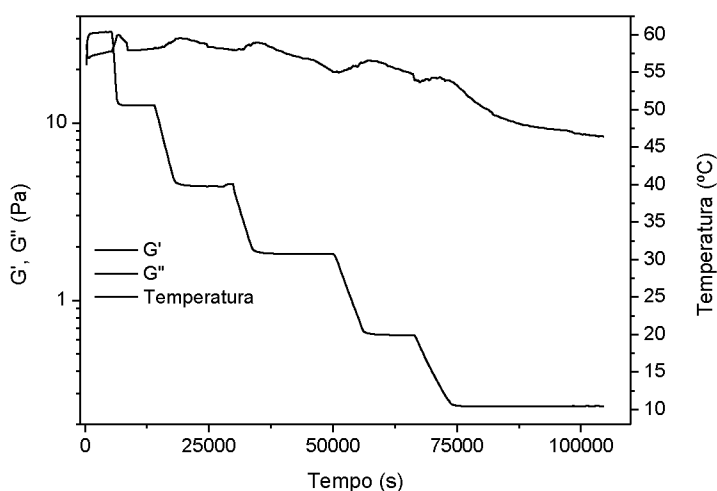
FIGURA 42 - MÓDULO DE ARMAZENAMENTO E PERDA EM $\omega = 0,92 \text{ rad s}^{-1}$ DE XGJ A 10 mg mL^{-1} COM Na_2SO_4 A $0,65 \text{ mol L}^{-1}$ EM DIFERENTES TEMPERATURAS DURANTE O ARREFECIMENTO DE 50°C A 10°C E SUBSEQUENTE AQUECIMENTO A 50°C . AS AMOSTRAS FORAM MANTIDAS $1,5 \text{ h}$ EM CADA TEMPERATURA, ANTES DE DETERMINAR OS MÓDULOS DE CISLHAMENTO.



Com a finalidade de avaliar se existe a possibilidade da termo-reversão para a amostra com maior concentração, a XGJ com Na_2SO_4 a 1 mol L^{-1} foi mantida por 8 h a temperatura constante de 10°C , e não houve a ocorrência da “despercolação” total, porém, como já visto na FIGURA 41A, foi observado uma diminuição do módulo

elástico e aumento do componente viscoso da amostra, indicando desagregação parcial desta rede gelificada, conforme FIGURA 43.

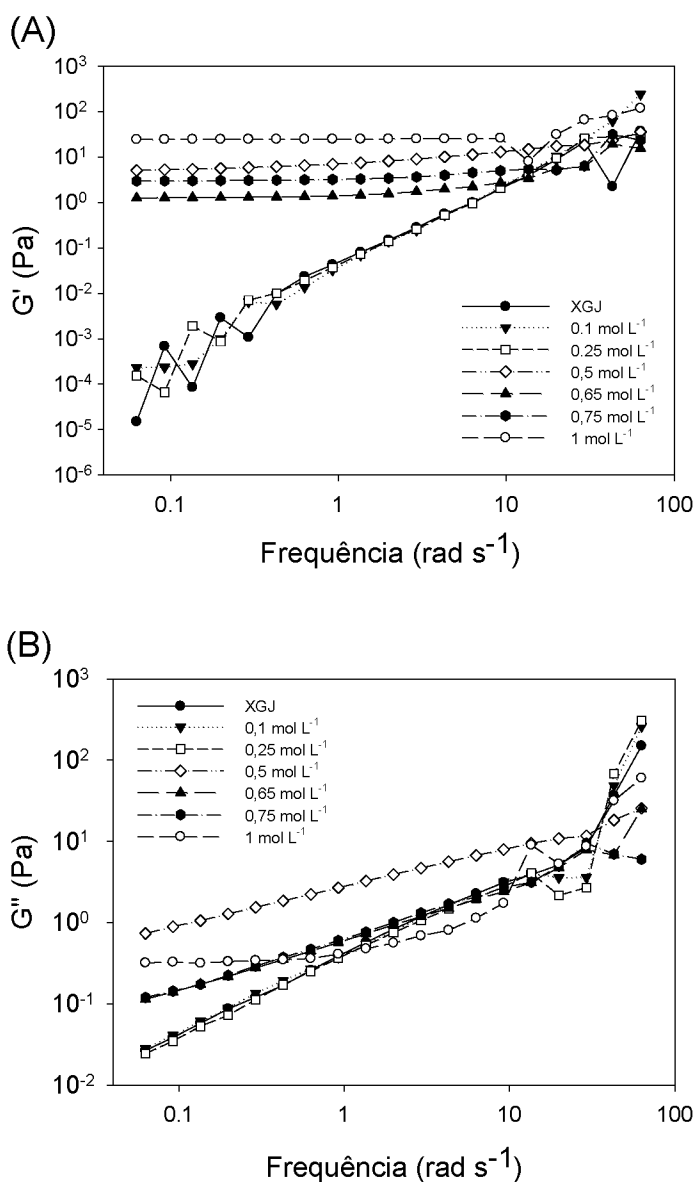
FIGURA 43 - G' (LINHA PRETA) E G'' (LINHA CINZA) PELO TEMPO (s), $\omega = 1,0 \text{ rad s}^{-1}$. DURANTE RESFRIAMENTO DE 60°C ATÉ 10°C (LINHA AZUL) PARA A AMOSTRA DE XGJ COM Na_2SO_4 A 1 mol L^{-1} . DADOS OBTIDOS APÓS FASE LAGE DE 16 HORAS. A RAMPA FOI CONSTRUÍDA COM A AMOSTRA PERMANECENDO DURANTE 1,5 HORA A UMA DADA TEMPERATURA E SEBSEGUENTE ABAIXAMENTO A CADA PASSO DE 10°C . NA TEMPERATURA DE 10°C A AMOSTRA PERMANECEU DURANTE 8 HORAS SOB MONITORAMENTO.



A FIGURA 44 mostra a dependência da frequência do G' e G'' para a XGJ e as dispersões de XGJ com Na_2SO_4 em várias concentrações. A solução de XGJ e as dispersões com concentrações menores de sal, apresentaram comportamento típico para soluções viscoelásticas, para as quais há formação de redes transitórias observadas em altas frequências. Nas dispersões com concentrações maiores de sal vê-se que o módulo de alta frequência permaneceu o mesmo para todas as amostras. Isto significa que a densidade de reticulações da rede transitória permaneceu a mesma, entretanto o tempo de duração dessas reticulações transitórias aumentou de acordo com a concentração de sal adicionado. Em baixas frequências observa-se o surgimento de um platô, indicando o surgimento de ligações intermoleculares geradas por redes permanentes ou com um tempo de duração maior (elevado tempo de relaxação).

A concentração do sal afeta não apenas a formação ou não do gel e o tempo de gelificação, mas também o tipo de contribuição da rede gelificada formada. A formação das reticulações podem ocorrer em algumas amostras devido à presença mais predominante de redes permanentes, enquanto em outras a contribuição maior é de redes quase-permanentes, ou seja, redes transientes com um tempo de duração maior.

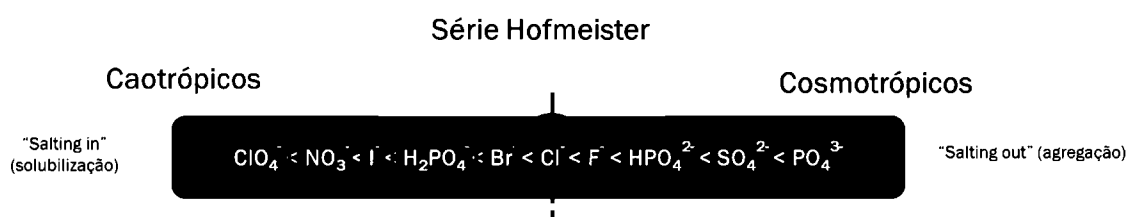
FIGURA 44 - G' (A) E G'' (B) EM FUNÇÃO DA FREQUÊNCIA ANGULAR, A TEMPERATURA DE 50 °C, PARA A SOLUÇÃO DE XGJ E PARA AS DISPERSÕES DE XGJ COM Na_2SO_4 A 0,1 mol L⁻¹ (VERMELHO), A 0,25 mol L⁻¹ (VERDE), A 0,5 mol L⁻¹ (AMARELO), A 0,65 mol L⁻¹ (AZUL), A 0,75 mol L⁻¹ (ROSA), A 1 mol L⁻¹ AZUL CLARO).



5.2 AVALIAÇÃO DE POSSÍVEL GELIFICAÇÃO COM OUTROS SAIS

Os dados apresentados até agora foram produzidos acrescentando o sulfato de sódio à solução polimérica. As próximas análises, tiveram como objetivo utilizar outros ânions presentes na Série de Hofmeister com menor caráter cosmotrópico que o sulfato (SO_4^{2-}), entretanto, o cátion utilizado será o mesmo. Dentre esses ânions, para a realização de análises dinâmicas oscilatórias, os escolhidos foram o íon monohidrogênio fosfato (HPO_4^{2-}), o íon cloreto (Cl^-), o íon dihidrogênio fosfato (H_2PO_4^-) e o íon nitrato (NO_3^-), os quais estão assinalados na FIGURA 45.

FIGURA 45 – ÂNIOS DA SÉRIE DE HOFMEISTER ORDENADOS DE ACORDO COM O CARÁTER MAIS CAOTRÓPICO ATÉ O MAIS COSMOTRÓPICO.

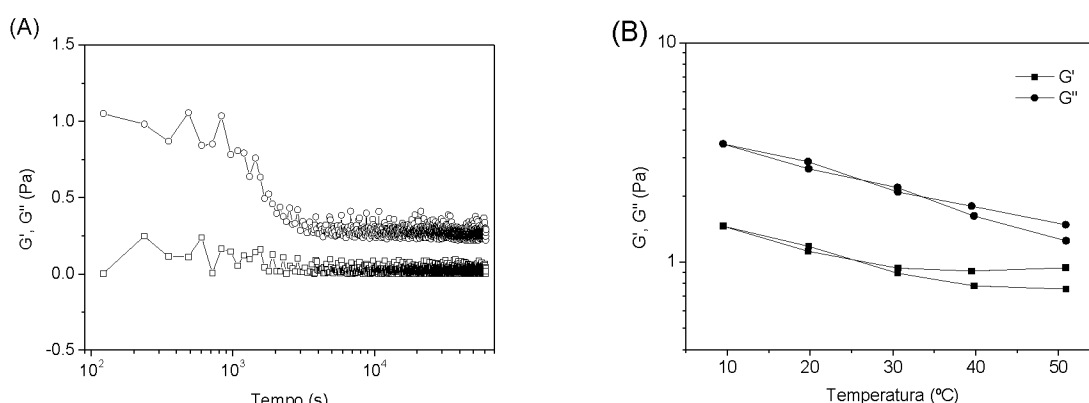


FONTE: O autor.

Na FIGURA 46 estão apresentados os dados obtidos após a adição de nitrato de sódio (NaNO_3) a 1 mol L^{-1} à solução aquosa de XGJ a 10 mg mL^{-1} . Pode-se observar em (A) que em nenhum momento, durante as 16 horas de aquecimento, no qual a amostra permaneceu à temperatura constante de 50°C , houve a gelificação. Neste caso, com o aumento da temperatura, ocorreu uma diminuição nos componentes viscoelásticos da amostra. Os dados em (B) vêm a corroborar com a observação de que o aumento da temperatura pode promover um discreto aumento na solubilidade da amostra, na presença de um sal caotrópico.

FIGURA 46 - (A) G' (\square) E G'' (\circ) COMO FUNÇÃO DO TEMPO PARA A XGJ A 10 mg mL^{-1} COM NaNO_3 A 1 mol L^{-1} EM VELOCIDADE ANGULAR DE $\omega = 1,0 \text{ rad s}^{-1}$. RAMPA DE AQUECIMENTO ATÉ 50°C E FASE LAGE DE 16 HORAS.

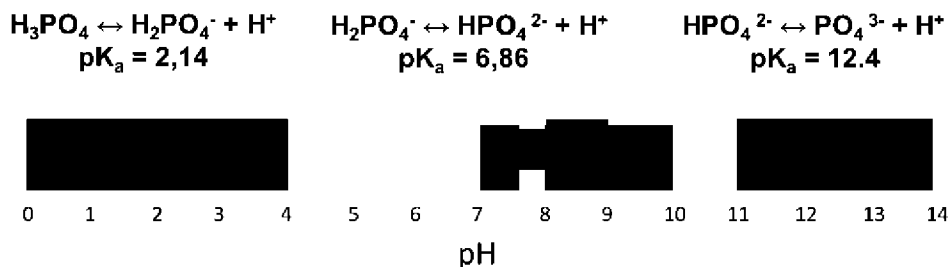
(B) MÓDULO DE ARMAZENAMENTO (\blacksquare) E PERDA (\bullet) EM DIFERENTES TEMPERATURAS DURANTE O ARREFECIMENTO DE 50°C A 10°C E SUBSEQUENTE AQUECIMENTO A 50°C , EM $\omega = 6,28 \text{ rad s}^{-1}$. PARA A AMOSTRAS D XGJ A 10 mg mL^{-1} COM NaNO_3 A 1 mol L^{-1} . A AMOSTRA FOI MANTIDA DURANTE 1,5 h EM CADA TEMPERATURA, ANTES DOS MÓDULOS DE CISLHAMENTO SEREM DETERMINADOS.



O fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4) é um sal inorgânico utilizado em muitos métodos analíticos e em soluções tampão (Human Metabolome Database (HMDB), 2018). Em solução aquosa dissocia-se formando o cátion Na^+ e o ânion H_2PO_4^- , este último possui um caráter fortemente caotrópico, ou seja melhora a solubilização das macromoléculas, promovendo as interações hidrofílicas. (DRUGBANK, 2018).

O fosfato biácido (H_2PO_4^-) é um ácido fraco que juntamente com o fosfato monoácido (HPO_4^{2-}) constitui um efetivo sistema tampão biológico (KRIGER; MOYSÉS; MOYSÉS-TETU, 2017). A constante de ionização do H_2PO_4^- é de 6,86 podendo resistir a uma variação de pH entre 6,4 a 7,4, ou seja, em valores de pH semelhantes a esses a concentração dos íons H_2PO_4^- e HPO_4^{2-} está em equilíbrio (FIGURA 47).

FIGURA 47 – IONIZAÇÃO DO HIDROGÊNIO DO ÁCIDO FOSFÓRICO E OS pK_a CORRESPONDENTES E AS FAIXAS DE pH EM QUE ELE ATUA COMO TAMPÃO.



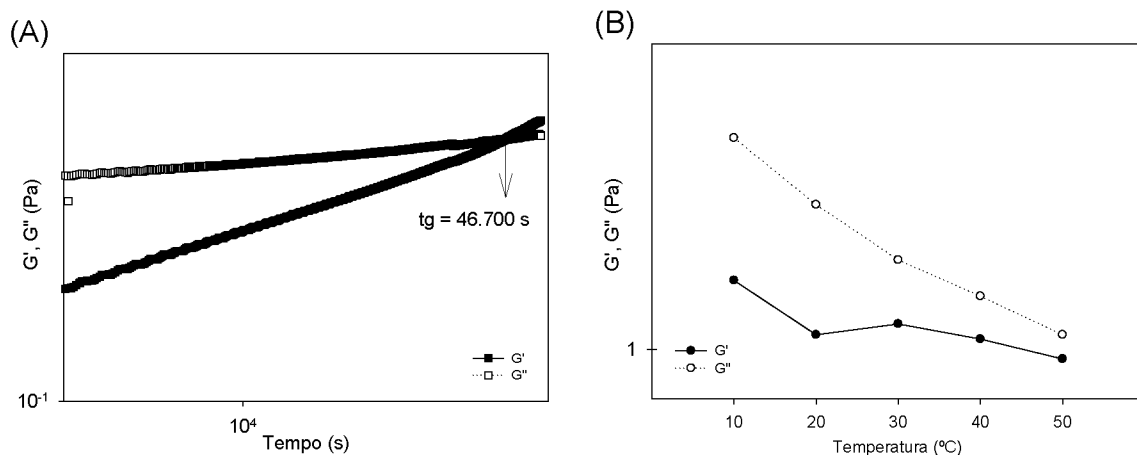
FONTE: Adaptado de Cury, Tenuta e Tabchoury, 2017.

O acompanhamento dos módulos de armazenamento (G') e perda (G'') das amostras de XGJ com NaH_2PO_4 a 1 mol L^{-1} ao longo do tempo, à temperatura de 50°C e $\omega = 1,0 \text{ rad s}^{-1}$, mostraram que houve um aumento gradual do G' até que em 46.700 segundos houve a gelificação. Entretanto, a formação dessa rede reticulada não foi suficientemente forte, ou possuíam um tempo de duração muito curto (redes quasi-permanentes). Na FIGURA 48 (B) observamos que, em nenhuma temperatura, em $\omega = 6,28 \text{ rad s}^{-1}$, o módulo elástico é maior que o viscoso, significando que não houve a formação do gel.

O valor de pH da solução de NaH_2PO_4 a 1 mol L^{-1} é de 4,0, o que indica que provavelmente uma pequena fração do fosfato biácido tenha se dissociado em fosfato monoácido. Portanto, provavelmente a formação dos pontos de reticulação nas dispersões de XGJ com NaH_2PO_4 estão relacionadas a presença do íon HPO_4^{2-} que possui um caráter mais cosmotrópico e não do íon $H_2PO_4^-$ que é considerado mais caotrópico.

FIGURA 48 - (A) G' (-■-) E G'' (-□-) COMO FUNÇÃO DO TEMPO PARA A XGJ A 10 mg mL^{-1} COM NaH_2PO_4 A 1 mol L^{-1} EM VELOCIDADE ANGULAR DE $\omega = 1,0 \text{ rad s}^{-1}$, $T = 50 \text{ }^\circ\text{C}$. O TEMPO DE GELIFICAÇÃO ESTÁ INDICADO NA FIGURA (tg).

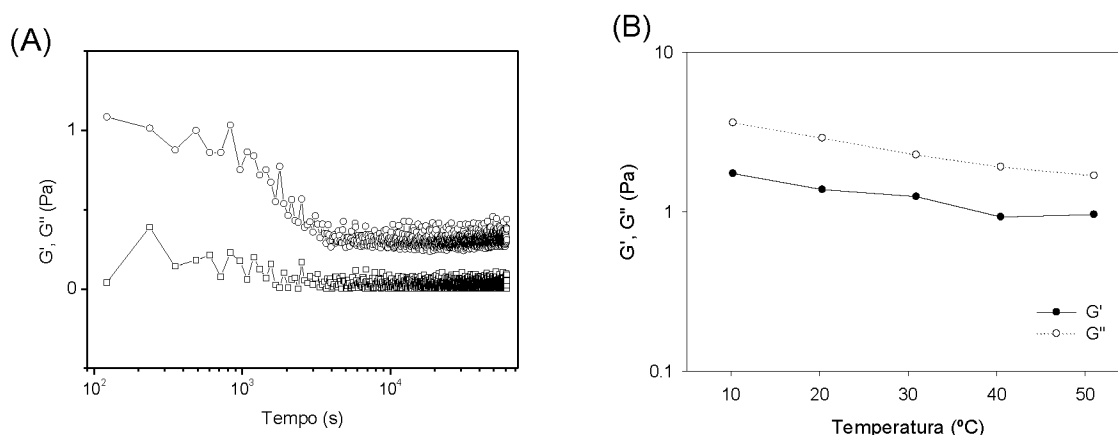
(B) MÓDULO DE ARMAZENAMENTO (-●-) E PERDA (··○··) A DIFERENTES TEMPERATURAS DURANTE O RESFRIAMENTO DE $50 \text{ }^\circ\text{C}$ A $10 \text{ }^\circ\text{C}$ EM $\omega = 6,28 \text{ rad s}^{-1}$. PARA A AMOSTRAS DE XGJ A 10 mg mL^{-1} COM NaH_2PO_4 A 1 mol L^{-1} . A AMOSTRA FOI MANTIDA DURANTE 1,5 h EM CADA TEMPERATURA, ANTES DOS MÓDULOS DE CISLHAMENTO SEREM DETERMINADOS.



Na FIGURA 49 estão apresentados os testes dinâmicos oscilatórios para as amostras de XGJ as quais foram acrescidas de NaCl a 1 mol L^{-1} . Os dados das análises mostram que não houve a formação de gel, mesmo em temperaturas diferentes. Tanto o ânion Cl^- quanto o cátion Na^+ , estão no meio da Série de Hofmeister, provavelmente por isso não foram observadas mudanças no módulo de cisalhamento elástico.

FIGURA 49 - (A) G' (\square -) E G'' (\circ -) COMO FUNÇÃO DO TEMPO PARA A XGJ A 10 mg mL^{-1} COM NaCl A 1 mol L^{-1} EM VELOCIDADE ANGULAR DE $\omega = 1,0 \text{ rad s}^{-1}$. RAMPA DE AQUECIMENTO ATÉ 50°C E FASE LAG DE 16 HORAS.

(B) MÓDULO DE ARMAZENAMENTO (\bullet -) E PERDA (\circ -) EM DIFERENTES TEMPERATURAS DURANTE O ARREFECIMENTO DE 50°C A 10°C E SUBSEQUENTE AQUECIMENTO A 50°C , EM $\omega = 6,28 \text{ rad s}^{-1}$. PARA A AMOSTRAS DE XGJ A 10 mg mL^{-1} COM NaCl A 1 mol L^{-1} . A AMOSTRA FOI MANTIDA DURANTE 1,5 h EM CADA TEMPERATURA, ANTES DOS MÓDULOS DE CISLHAMENTO SEREM DETERMINADOS.

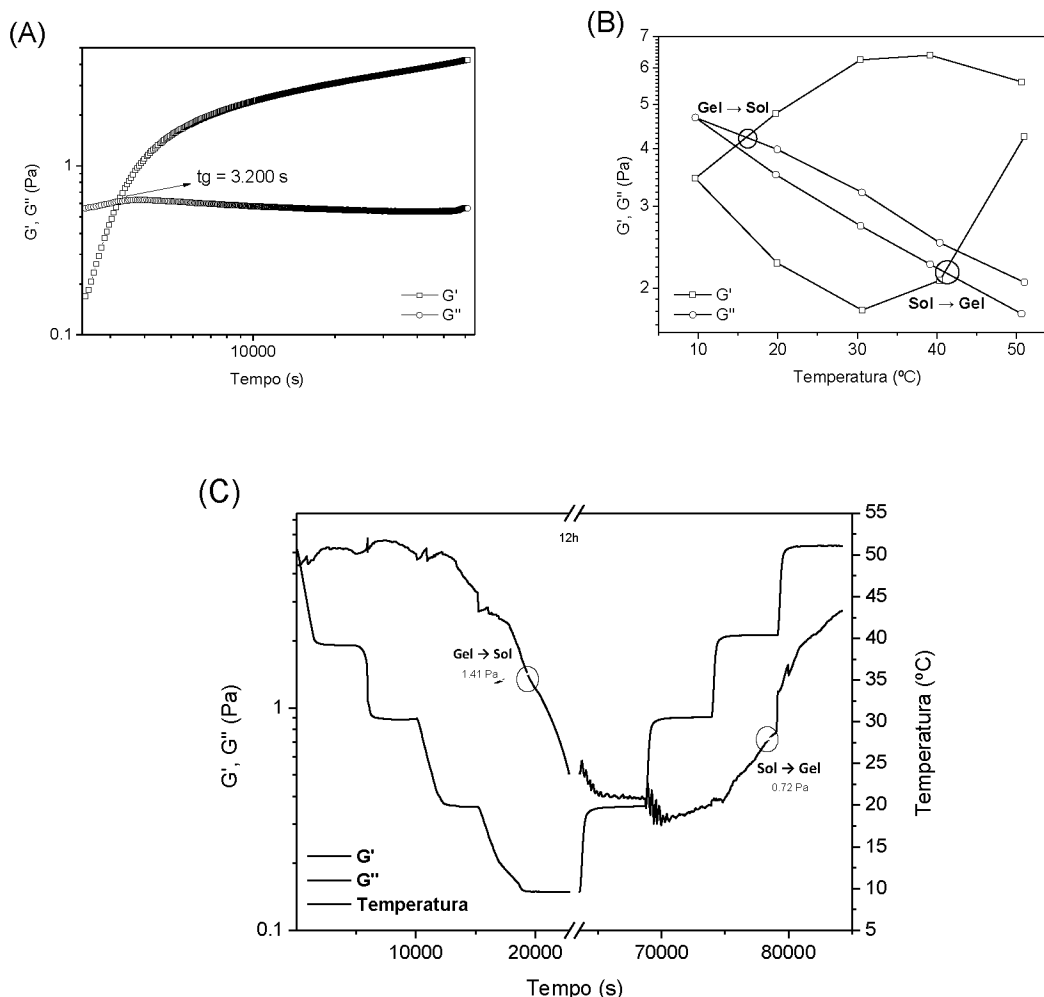


Por último foi realizado a avaliação da adição do sal Fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4) 1 mol L^{-1} à solução aquosa de XGJ, com pH final de 9,0. Por ser um sal altamente higroscópico foi necessário colocá-lo em estufa a 40°C por 24 h antes de ser adicionado. Os resultados dos testes reológicos estão apresentados na FIGURA 50, e observa-se que no tempo de 3.200 segundos ocorreu a gelificação ($G'=G''$). Este tempo é semelhante a XGJ com $0,75 \text{ mol L}^{-1}$ de Na_2SO_4 . Inclusive as temperaturas de transição do estado Gel-Sol a 16°C e Sol-Gel, a 41°C , são semelhantes ao $0,75 \text{ mol L}^{-1}$ de Na_2SO_4 . Semelhante ao que ocorreu com o ânion monohidrogênio fosfato, nesta faixa de pH uma fração do ânion dihidrogênio fosfato pode ter se dissociado em PO_4^{4-} que é fortemente cosmotrópico. Contribuindo para a formação dos pontos de reticulação.

FIGURA 50 - (A) G' (\square) E G'' (\circ) COMO FUNÇÃO DO TEMPO PARA XGJ 10 mg mL^{-1} COM NaHPO_4 A 1 mol L^{-1} EM VELOCIDADE ANGULAR DE $\omega = 6,28 \text{ rad s}^{-1}$, A 50°C . O TEMPO DE GELIFICAÇÃO ESTÁ INDICADO NA FIGURA (t_g).

(B) MÓDULO DE ARMAZENAMENTO (\bullet) E PERDA (\circ) EM DIFERENTES TEMPERATURAS DURANTE O ARREFECIMENTO DE 50°C A 10°C E SUBSEQUENTE AQUECIMENTO A 50°C , EM $\omega = 6,28 \text{ rad s}^{-1}$. PARA A AMOSTRAS DE XGJ A 10 mg mL^{-1} COM NaHPO_4 A 1 mol L^{-1} . A AMOSTRA FOI MANTIDA DURANTE 1,5 h EM CADA TEMPERATURA, ANTES DOS MÓDULOS DE CISLHAMENTO SEREM DETERMINADOS.

(C) G' (PRETO), G'' (CINZA) PELO TEMPO EM DIFERENTES TEMPERATURAS DURANTE O ARREFECIMENTO E AQUECIMENTO DE 50°C A 10°C E SUBSEQUENTE AQUECIMENTO A 50°C , EM $\omega = 1,0 \text{ rad s}^{-1}$. PARA A AMOSTRAS DE XGJ A 10 mg mL^{-1} COM NaHPO_4 A 1 mol L^{-1} . A AMOSTRA FOI MANTIDA DURANTE 1,5 h EM CADA TEMPERATURA, ANTES DOS MÓDULOS DE CISLHAMENTO SEREM DETERMINADOS.

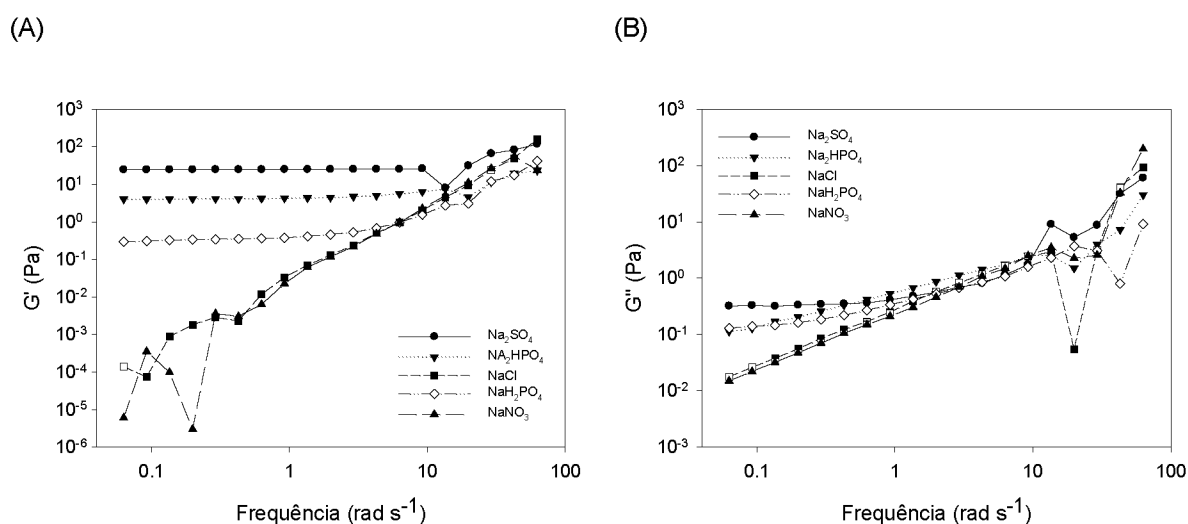


A FIGURA 50 (C) apresenta o gráfico que corresponde a mensuração dos módulos de cisalhamento G' e G'' ao longo do tempo em diferentes temperaturas com

passo de 10 °C entre elas e permanência nesta para a estabilização durante 1,5 horas, a frequência angular de $\omega = 1,0 \text{ rad s}^{-1}$.

O acompanhamento dos módulos em uma frequência menor que a utilizada para realizar a rampa de temperatura (FIGURA 50 B) pode indicar que a formação da rede de reticulações permanentes inicia-se em temperaturas menores. Tais reticulações permanentes dominam a rede transiente observada em altas frequências, sendo observadas em todo o espectro mecânico. É a soma dessas duas contribuições que fazem com que haja a formação do gel, observada quando os módulos de elasticidade são maiores que a contribuição viscosa. Da mesma forma que a XGJ com $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, $0,65 \text{ mol L}^{-1}$ e $0,75 \text{ mol L}^{-1}$, a rede gelificada formada não possui a mesma força que a inicial. Mesmo quando acrescentamos outro sal cosmotrópico é possível obter géis termo-reversíveis, entretanto os géis reformados possuem uma densidade menor de reticulação em comparação com o gel inicialmente formado.

FIGURA 51 - G' (A) E G'' (B) EM FUNÇÃO DA FREQUÊNCIA ANGULAR, A TEMPERATURA DE 50 °C, PARA AS DISPERSÕES DE XGJ À $C = 10 \text{ mg mL}^{-1}$ COM Na_2SO_4 A 1 mol L^{-1} (PRETO), Na_2HPO_4 A 1 mol L^{-1} (VERMELHO), NaCl A 1 mol L^{-1} (VERDE), NaH_2PO_4 A 1 mol L^{-1} (AMARELO), NaNO_3 A 1 mol L^{-1} (AZUL).



Os módulos de cisalhamento para as amostras com a mesma concentração de sal, porém com sais diferentes mostra que quanto mais cosmotrópico o ânion maior o componente elástico na amostra e maior a contribuição da rede permanente. A

exceção é o ânion H_2PO_4^- que, apesar de ter caráter caotrópico maior que o Cl^- , apresentou a formação de redes permanentes ou quase permanentes, evidenciado pelo platô em baixas frequências (FIGURA 51, losango amarelo), enquanto o cloreto apenas apresentou comportamento típico de soluções viscoelásticas.

5.3 ANÁLISE DE MICROSCOPIA CONFOCAL POR VARREDURA A LASER

A técnica de microscopia confocal por varredura a laser, baseia-se na iluminação ponto-a-ponto de uma amostra marcada com um fluoróforo. Os microscópios confocais possuem um conjunto de lentes capazes de bloquear a luz refletida da amostra provenientes de planos focais, permitindo assim que a luz proveniente de apenas um plano focal chegue ao detector. Através da obtenção de imagens digitalizadas de diferentes planos focais é possível então a construção tridimensional da estrutura em estudo (RESENDE; SOCCOL, 2015).

O objetivo da utilização desta técnica, amplamente empregada para a caracterização de amostras biológicas, foi o de caracterizar o hidrogel de XGJ com sal cosmotrópico, uma vez que não é necessário que o gel passe por um processo de secagem, minimizando assim possíveis alterações na estrutura. Outra razão foi a possibilidade de obter imagens da dispersão a diferentes temperaturas e, assim, observar a transição da fase sol-gel e as estruturas formadas.

Na TABELA 1, tem-se as imagens de microscopia confocal da XGJ sem adição de Na_2SO_4 e com concentrações crescentes deste sal, em função da temperatura. As amostras foram preparadas de acordo com o descrito nos materiais e métodos e a obtenção das imagens foram realizadas a cada 10 °C, mantida por 1,5 h a cada temperatura previamente à realização dos ensaios de microscopia.

Na temperatura de 5 °C, as imagens das dispersões de XGJ com Na₂SO₄ a 0,5 mol L⁻¹; 0,75 mol L⁻¹ e 1 mol L⁻¹ assemelham-se com as imagens da XGJ sem adição de sal à temperatura de 20 °C. Como já mencionado anteriormente nas análises reológicas, em temperaturas baixas estas dispersões são caracterizadas como soluções viscoelásticas, ou seja, apresentam poucas reticulações. Com o aumento da temperatura ocorre o aparecimento de agregados, os quais são qualitativamente maiores na dispersão com maior concentração de sal.

O microscópio confocal utilizado nas análises possui banho termostático, entretanto este não pode ser usado em temperaturas inferiores a 20 °C, então para a obtenção das imagens de XGJ com sal à temperatura de 5 °C, as amostras foram colocadas em banho de gelo até 5°C, e sequencialmente no suporte do equipamento termostatizado. Este procedimento de expor as amostras à temperatura de 5°C, pode ter ocasionado uma parcial desagregação e despercolação da rede reticulada formada na amostra de XGJ com Na₂SO₄ a 1 mol L⁻¹. Uma parcial despercolação foi observada nos ensaios dinâmicos oscilatórios a 10 °C, devido a uma queda no módulo elástico e aumento do módulo viscoso ao longo do tempo. Sendo assim a desagregação e a despercolação da rede gelificada para a amostra de XGJ com maior concentração de sal é possível através do abaixamento drástico da temperatura.

A formação de uma rede reticulada começou a ser observada com o aumento da temperatura, de forma dependente da concentração de sal na amostra e ocorreu de forma mais abrupta para a XGJ com Na₂SO₄ a 1 mol L⁻¹, a qual apresentou também a presença de grandes agregados (TABELA 4).

TABELA 4 - IMAGENS DE MICROSCOPIA CONFOCAL PORVARREDURA A LSER DA XGJ NATIVA (1% m/m) E COM CONCENTRAÇÃO DE Na₂SO₄ DE 0,1 mol L⁻¹, 0,5 mol L⁻¹, 0,75 mol L⁻¹ E 1 mol L⁻¹, APÓS PERMANECEREM 16 HORAS A TEMPERATURA CONSTANTE DE 50 °C E ARREFECIMENTO A TEMPERATURA DE 40 °C, 30 °C, 20 °C E 5 °C. MAGNIFICAÇÃO DE 60X.

* TEMPERATURA APROXIMADA DE 5 °C

** A IMAGEM CAPTURADA DA XGJ COM Na₂SO₄ A 0,75 mol/L NA TEMPERATURA INDICADA, FOI OBTIDA COM MAGNIFICAÇÃO DE 60X E ZOOM DE 4X



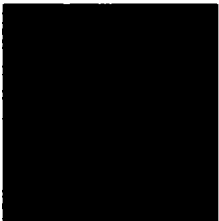
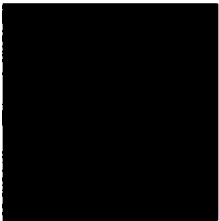
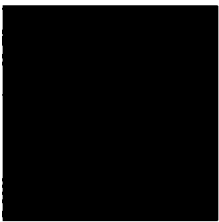




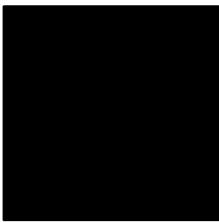

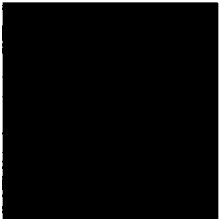








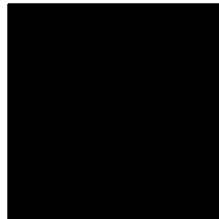



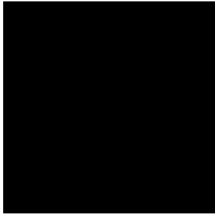


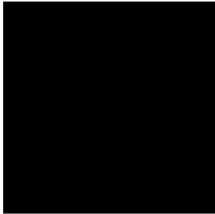



| Amostra | Temperatura | | | | |
|--|---|---|--|---|---|
| | 5° C* | 20° C** | 30° C** | 40° C | 50° C |
| XGJ 10 mg mL ⁻¹ |  |  |  |  |  |
| XGJ 10 mg mL ⁻¹ Na ₂ SO ₄ 0,1 mol L ⁻¹ |  |  |  |  |  |
| XGJ 10 mg mL ⁻¹ Na ₂ SO ₄ 0,5 mol L ⁻¹ |  |  |  |  |  |
| XGJ 10 mg mL ⁻¹ Na ₂ SO ₄ 0,75 mol L ⁻¹ |  |  |  |  |  |
| XGJ 10 mg mL ⁻¹ Na ₂ SO ₄ 1 mol L ⁻¹ |  |  | | | |

TABELA 5 - IMAGENS DE MICROSCOPIA CONFOCAL POR VARREDURA A LASER DA XGJ NATIVA A 10 mg mL^{-1} E COM Na_2SO_4 A $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, $0,75 \text{ mol L}^{-1}$ e 1 mol L^{-1} , APÓS PERMANECEREM 16 HORAS A TEMPERATURA CONSTANTE DE 50°C E POSTERIOR ARREFECIMENTO A TEMPERATURA DE 40°C , E 20°C . MAGNIFICAÇÃO DE 60X, ZOOM DE 4X.

| Amostra | Temperatura | | |
|--|---|--|---|
| | 20°C | 40°C | 50°C |
| XGJ 1% (m/m) $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ Na_2SO_4 |  |  |  |
| XGJ 1% (m/m) $0,75 \text{ mol L}^{-1}$ Na_2SO_4 |  |  |  |
| XGJ 1% (m/m) 1 mol L^{-1} Na_2SO_4 |  |  |  |

Com um aumento de 240 X (Tabela 5) das imagens de microscopia com pode-se vizualizar melhor essa rede reticulada. Existe semelhança na característica do gel, contudo, quanto maior a concentração do sal cosmotrópico, mais compacta essa rede reticulada aparenta ser em altas temperaturas.

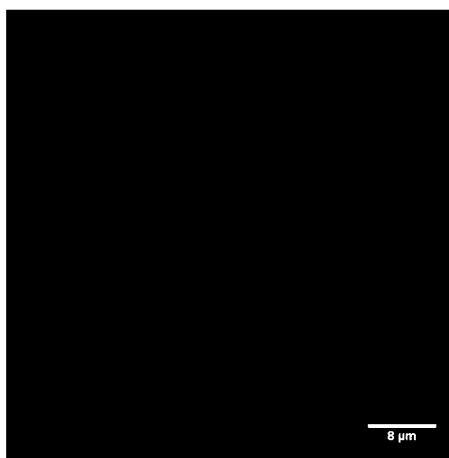
TABELA 6 - IMAGENS DE MICROSCOPIA CONFOCAL POR VARREDURA A LASER DA XGJ COM Na₂SO₄ A 0,5 mol L⁻¹, 0,75 mol L⁻¹ E 1 mol L⁻¹. NO TEMPO 0 A IMAGEM FOI OBTIDA À TEMPERATURA AMBIENTE DE 20 °C E NOS TEMPOS DE 1 HORAS, 2,5 HORAS, 3 HORAS, 4 HORAS, 10 HORAS E 24 HORAS APÓS PERMANECER À TEMPERATURA CONSTANTE DE 50 °C. MAGNIFICAÇÃO DE 60X.

| Amostras | Tempo | | | | | | |
|---|-------|-----|-------|-----|-----|------|------|
| | 0 | 1 h | 2,5 h | 3 h | 4 h | 10 h | 24 h |
| XGJ | | | | | | | |
| 10 mg mL ⁻¹ Na ₂ SO ₄ 0,5 mol L ⁻¹ | | | | | | | |
| XGJ | | | | | | | |
| 10 mg mL ⁻¹ Na ₂ SO ₄ 0,75 mol L ⁻¹ | | | | | | | |
| XGJ | | | | | | | |
| 10 mg mL ⁻¹ Na ₂ SO ₄ 1 mol L ⁻¹ | | | | | | | |

Com a finalidade de ampliar o entendimento na formação da rede reticulada, imagens durante a formação do gel ao longo do tempo foram capturadas e estão ordenadas na TABELA 6. Nelas observa-se que mesmo no tempo 0 à temperatura de 20 °C, já é observada a formação de longas fibras dispersas na solução de XGJ com Na_2SO_4 a 1 mol L^{-1} , o qual não é observado em outras amostras. Após 1 hora a temperatura de 50 °C ocorreu o entrelaçamentos dessa fibras, formando vários pontos de reticulação que, com o passar do tempo, aumentam a ponto dessas fibras não serem mais observadas. Para as concentrações menores a formação dessa rede ocorre de forma diferente. Primeiro vários pontos de agregação são vistos, e só então há a junção desses para a constituição da malha reticulada do gel.

Na FIGURA 52 é apresentado a imagem da dispersão de XGJ com Na_2SO_4 a 1 mol L^{-1} , após permanecer 1 hora à 50 °C. Nela observa-se que há a presença de longas fibras, possivelmente relacionadas à agregação de inúmeras fibras de XGJ. Assim, como uma análise complementar, mesmo com a possível perda da estrutura da rede reticulada que o processo de secagem possa acarretar, as análises utilizando Microscopia Eletrônica de Varredura, sucederam-se para que imagens com maiores magnificações e mais nitidez pudessem ser capturadas do gel.

FIGURA 52 – IMAGEM DE MICROSCOPIA CONFOCAL POR VARREDURA A LASER DA XGJ A 10 mg mL^{-1} COM Na_2SO_4 A 1 mol L^{-1} , APÓS A PERMANÊNCIA DURANTE 1 HORA A TEMPERATURA DE 50 °C. MAGNIFICAÇÃO DE 60X E ZOOM DE 4X.



5.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

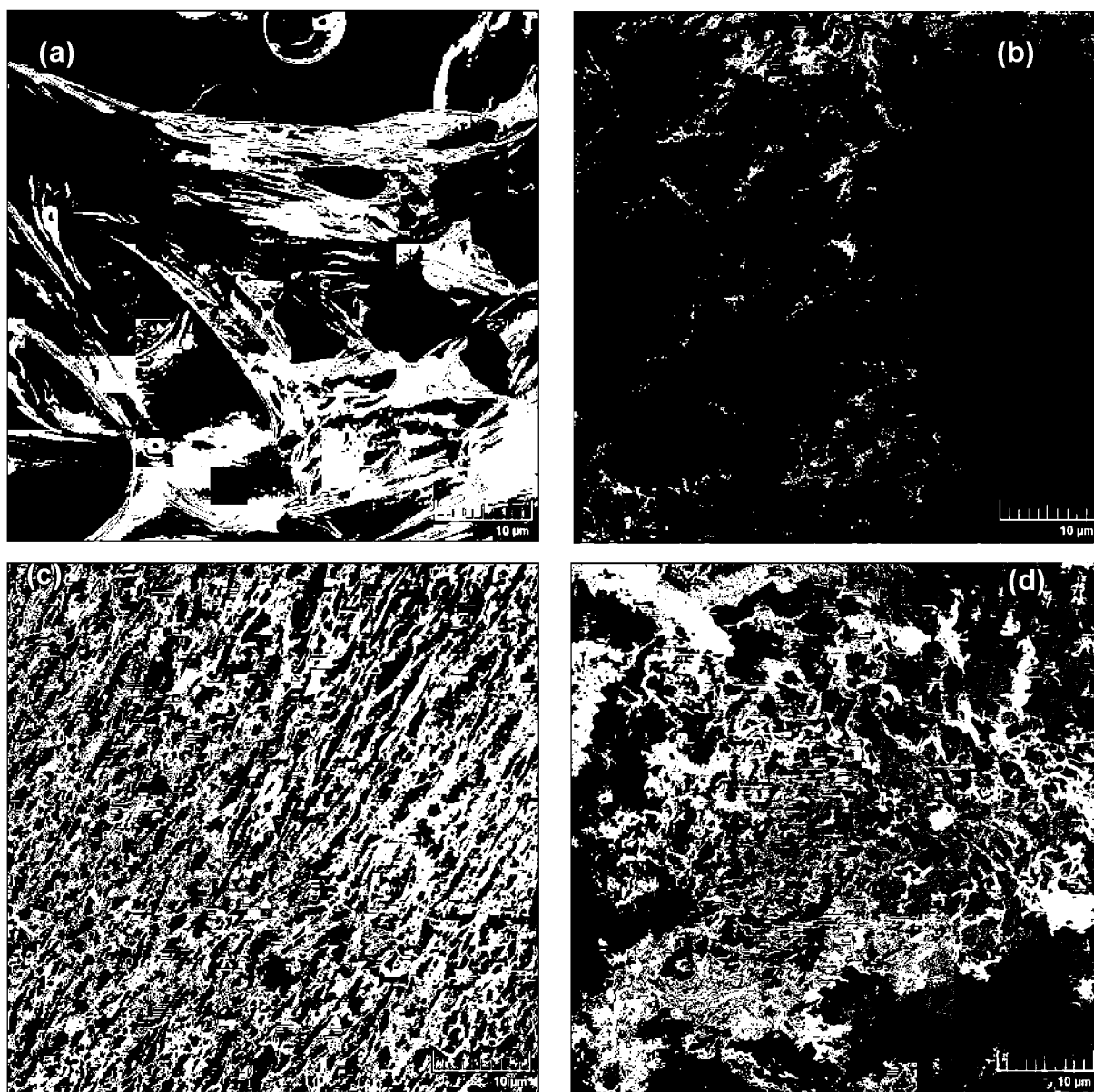
A visualização da microestrutura de um material é uma ferramenta importante para compreender a organização do gel, entretanto em muitos casos isso não é possível ser realizado através da microscopia ótica (MO). Devido ao fato do MO utilizar a luz visível ou ultravioleta para iluminar um objeto a resolução desse microscópio é limitada pelos efeitos de difração relacionados ao comprimento de onda da luz incidente utilizada. Para aumentar a magnificação, ou seja, a ampliação, necessita-se de uma radiação com comprimento de onda menor que a luz visível (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007).

O microscópio eletrônico de varredura (MEV) utiliza finos feixes de elétrons, no lugar de fótons, para irradiar ponto a ponto a área a ser analisada. Como resultado, ocorre uma interação entre esses elétrons e a amostra gerando a emissão de elétrons secundários, retroespalhados, raios-X característicos, elétrons Auger, fótons entre outros. Dentre esses, os elétrons secundários e os retroespalhados são os de maior interesse. O primeiro responsável por formar a imagem de alta resolução (3-5 nm), o segundo por fornecer imagem da composição dos elementos presente na amostra (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007; MALISKA, 2018).

Portanto, a técnica de MEV foi utilizada com a finalidade de capturar imagens em alta resolução dos géis formados e visualizar a distribuição do sal na amostra através da técnica complementar de análise química por espectroscopia de energia dispersiva (EDS). As amostras foram preparadas de acordo com o que foi descrito no matérias e métodos.

Na FIGURA 53 é apresentado as imagens microscópicas com magnificação de 5kX, da XGJ sem adição de sal cosmotrópico e com adição crescente de Na_2SO_4 . Comparando-se a XGJ nativa com as amostras contendo sal cosmotrópico observa-se o quanto a presença desse afetou a solução aquosa de XGJ. A presença do sal promoveu a agregação das cadeias poliméricas com formatos irregulares, os quais podem ser mais bem visualizados nas magnificações de maiores.

FIGURA 53 – IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DAS AMOSTRAS DE XGJ NATIVA A 10 mg mL^{-1} (a) XGJ 10 mg mL^{-1} COM Na_2SO_4 A $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ (b); COM Na_2SO_4 A $0,75 \text{ mol L}^{-1}$ (c); E COM Na_2SO_4 A 1 mol L^{-1} (d). MAGNIFICAÇÃO 5kX E HV 15,0 kV.



Apesar das amostras terem sido submetidas ao processo de secagem, foi possível observar a estrutura do gel, a qual permaneceu intacta. Nas ampliações maiores de 20 kX e 50 kX, observou-se uma discreta diferença na constituição das estruturas dos géis com diferentes concentrações de sal cosmotrópico. Na amostra de XGJ com Na_2SO_4 a 1 mol L^{-1} a forma destas estruturas é mais regular, enquanto em concentrações menores essas partículas não possuem forma definida. Portanto,

a concentração de Na_2SO_4 adicionada a solução aquosa de XGJ afetou também a formação das redes que constituem o gel.

FIGURA 54 – IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DAS AMOSTRAS DE XGJ A 10 mg mL^{-1} COM Na_2SO_4 A $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ (a); COM Na_2SO_4 A $0,75 \text{ mol L}^{-1}$ (b); COM Na_2SO_4 A 1 mol L^{-1} (c). MAGNIFICAÇÃO 20kx E HV 15,0 kV.

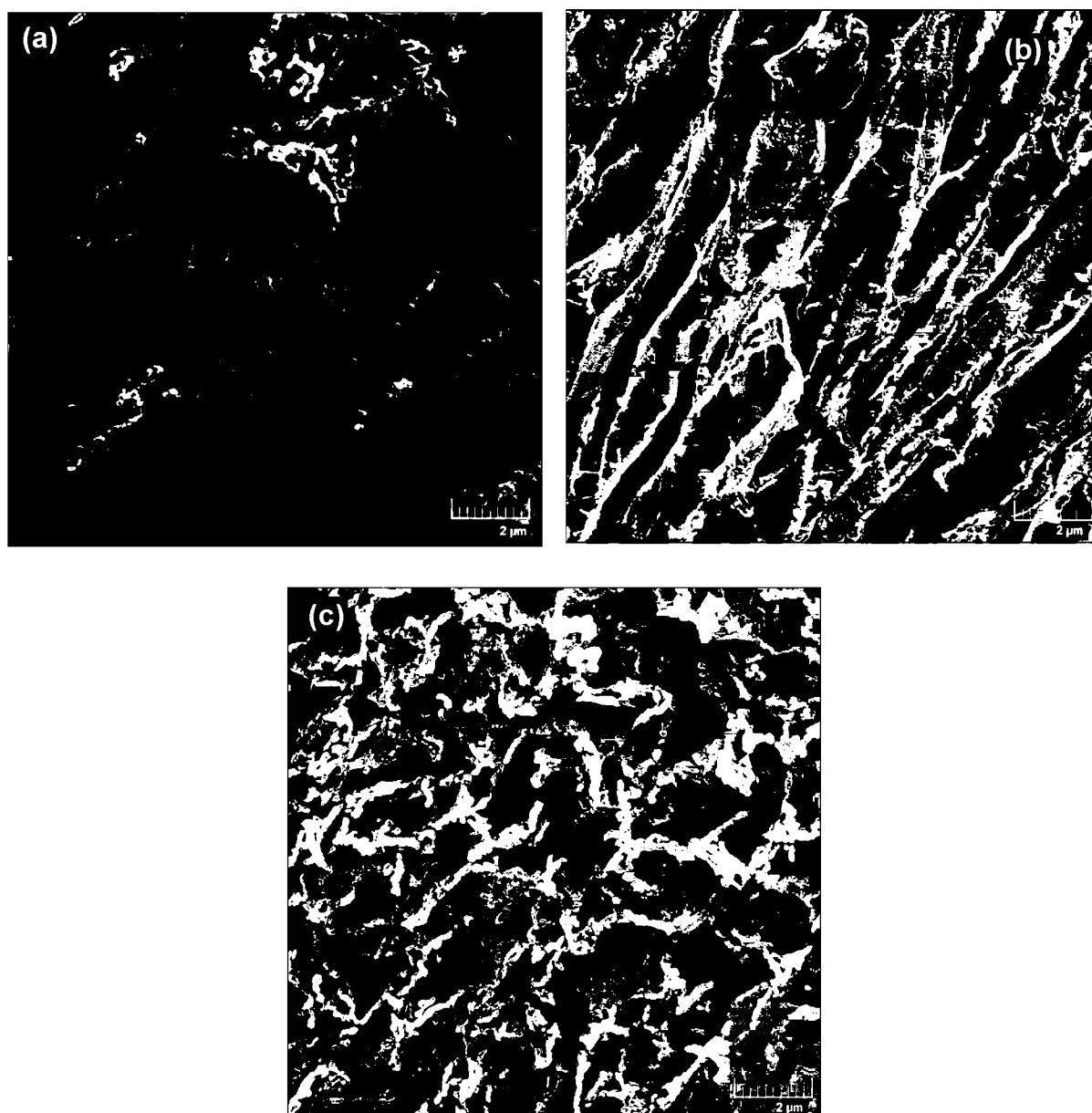
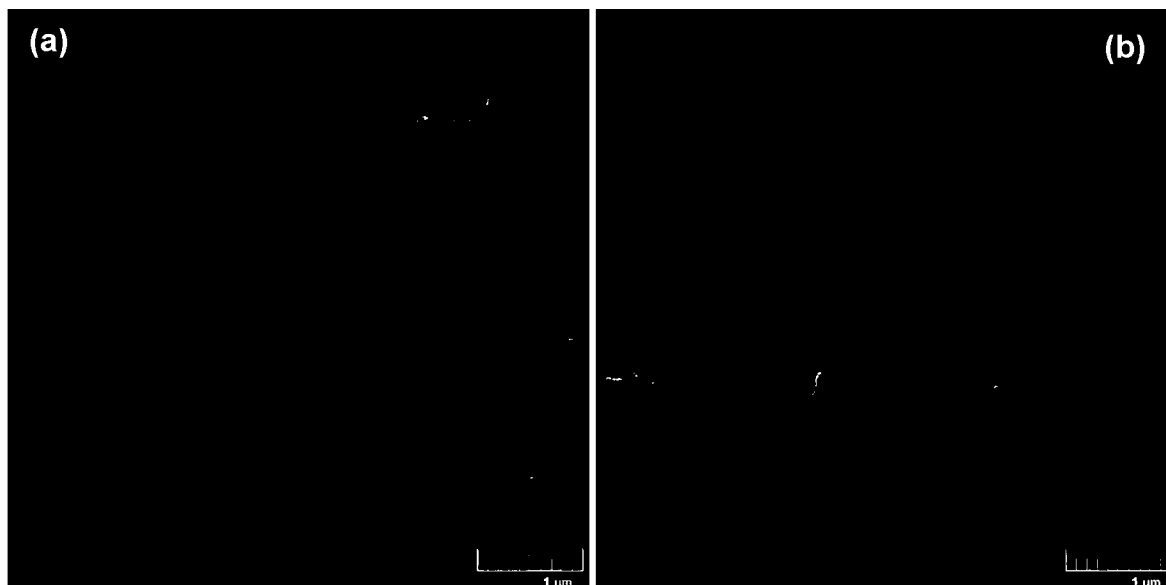


FIGURA 55 – IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRONICA DE VARREDURA DAS AMOSTRAS DE XGJ A 10 mg mL^{-1} COM Na_2SO_4 A $0,75 \text{ mol L}^{-1}$ (a); COM Na_2SO_4 A 1 mol L^{-1} (b). MAGNIFICAÇÃO 50kx E HV 15,0 kV.



5.4.1 Espectroscopia de Energia Dispersiva

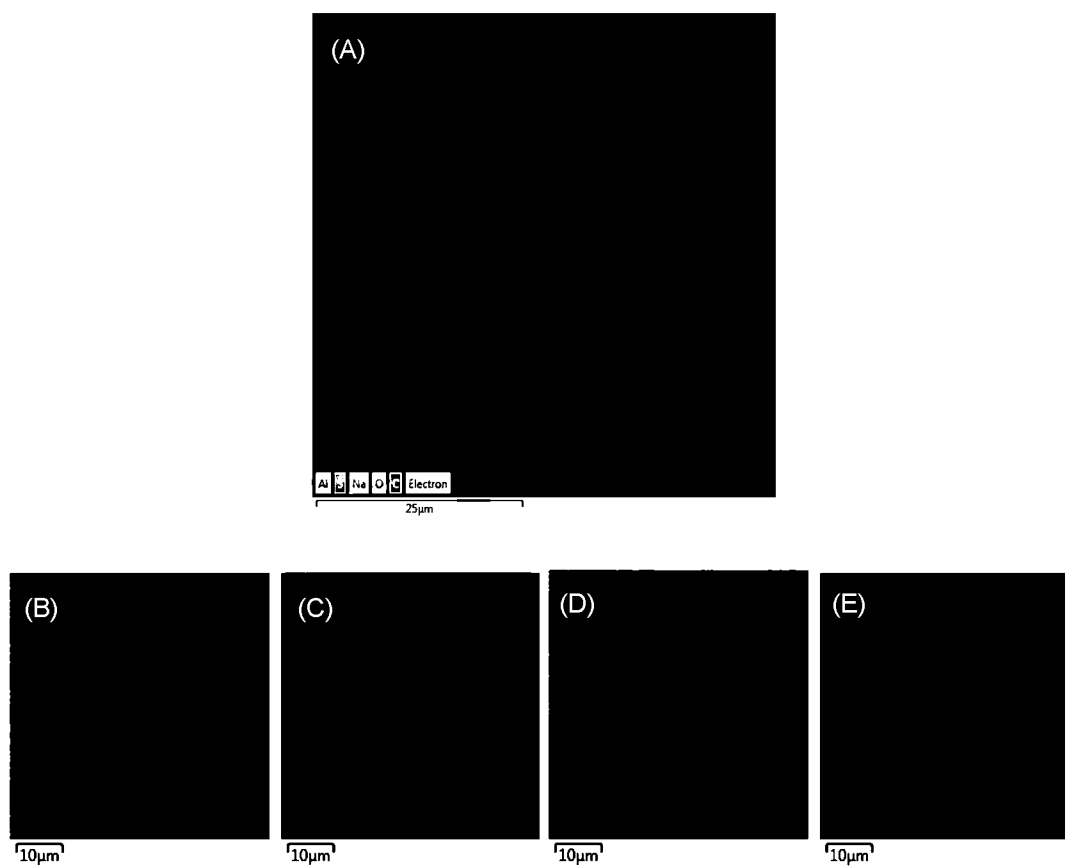
A técnica espectroscópica de energia dispersiva (EDS) fornece o número atômico dos elementos químicos presentes na amostra, bem como a porcentagem desses elementos existente no meio. Isto é possível porque, durante as análises, a interação entre o feixe de elétrons e a amostra gera a emissão de fótons. O comprimento de onda ou a energia gerada, as quais são características do número atômico da amostra, são utilizados então para determinar qual o elemento químico responsável pela emissão da radiação. Por meio de cálculos é possível também quantificar os elementos analisados (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007).

A realização dessa análise teve como objetivo observar a distribuição dos componentes do sal na amostra e assim visualizar se haveria a possibilidade destes componentes concentrados mais em uma região do que em outra.

As imagens de EDS não possuem alta resolução, por isso as estruturas visualizadas nas imagens do MEV não são observadas na FIGURA 55. Todavia é

possível perceber que a distribuição dos elementos químicos oxigênio (O), carbono (C), sódio (Na) e enxofre (S) estão dispostos de forma homogênea.

FIGURA 56 – IMAGENS DE EDS PARA A AMOSTRA DE XGJ COM Na_2SO_4 A $0,75 \text{ mol L}^{-1}$. (A) CORRESPONDE A COMPILAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DAS IMAGENS DOS ELEMENTOS QUÍMICOS SÓDIO (B); ENXOFRE (C); OXIGÊNIO (D) E CARBONO (E).



5.5 MEDIÇÕES DE MICROCALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA

As análises de micro Calorimetria Diferencial de Varredura (μ -DSC) foram realizadas de acordo com o descrito no material e método. Uma rampa de temperatura de 5 até 50 °C primeiramente foi realizada com a finalidade simular passos seguidos nos ensaios reológicos. Sequencialmente as amostras foram mantidas a temperatura de 50 °C por 16 horas para só então as rampas de aquecimento e resfriamento serem realizadas.

Na FIGURA 57 estão mostrados os gráficos de aquecimento inicial das amostras de XGJ com Na_2SO_4 a 0,75 mol L⁻¹ e 1 mol L⁻¹. Neles, pode-se observar que, para as amostras de XGJ com Na_2SO_4 a 0,75 mol L⁻¹, ocorre uma transição de fase de segunda ordem, na qual ocorre um aumento no fluxo de calor. Esta transição de fase pode estar correlacionada com as interações moleculares e o aumento das reticulações devido ao aumento da temperatura (TOLEDO, 2000). Portanto, com o aumento da temperatura há um abrupto acréscimo no número de reticulações, entretanto após ele ocorre de uma forma mais linear. Ao final da rampa há o surgimento de um evento térmico em $T = 41$ °C que pode estar relacionado à fusão ou desnaturação do polímero.

Para a amostra de XGJ com Na_2SO_4 a 1 mol L⁻¹ observa-se que inicialmente também ocorre uma transição de fase de segunda ordem relacionada ao aumento da reticulação polimérica, entretanto, durante esta transição, um evento exotérmico ocorre, relacionado a gelificação ou agregação do material.

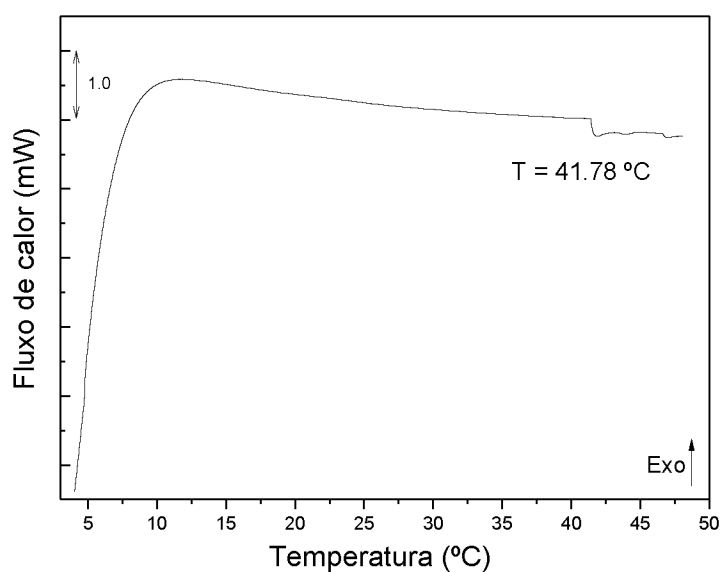
FIGURA 57 – GRÁFICOS DE AQUECIMENTO ATÉ A TEMPERATURA DE 50 °C, ANTES DAS AMOSTRAS SEREM MANTIDAS DURANTE 16 HORAS A 50 °C. (A) XGJ COM 0,75 mol L⁻¹ DE SAL; (B) XGJ COM 1 mol L⁻¹ DE SAL. TAXA DE AQUECIMENTO 0,5 °C min⁻¹.

* T_m = TEMPERATURA NO MEIO DO PICO

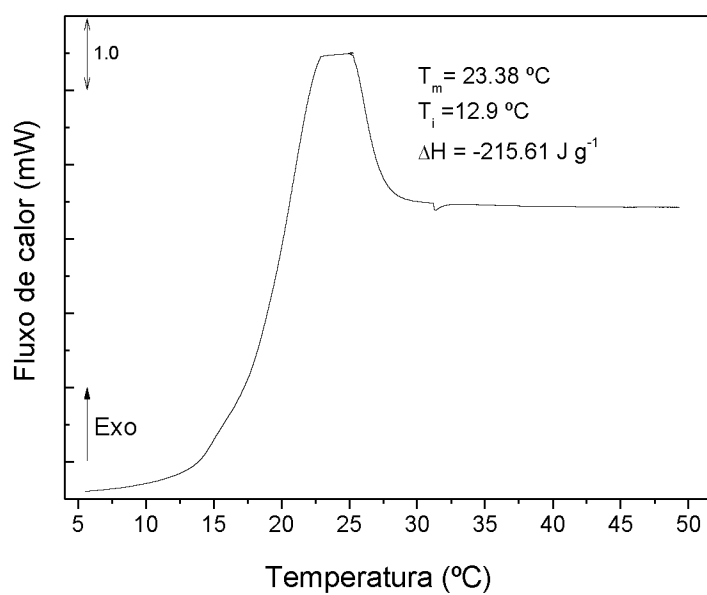
** T_i = TEMPERATUR INICIAL DA TRANSIÇÃO DE FASE

*** ΔH = VARIAÇÃO DE ENTALPIA

(A)



(B)



Com base nos gráficos de calorimetria, conclui-se que a formação do hidrogel de XGJ em várias concentrações de Na_2SO_4 ocorre de uma forma diferente em cada concentração. Enquanto, para a amostra com maior concentração de sal cosmotrópico observa-se um pico na rampa de aquecimento, relacionado à formação de gel ou agregados, para as amostras com menores concentrações este evento não ocorre. Os dados reológicos comprovam que em concentrações de Na_2SO_4 entre $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ a 1 mol L^{-1} ocorre a gelificação a temperaturas altas, o que nos leva a crer que a diferença entre estes géis é a formação e tamanho dos agregados. A presença desses agregados em maior tamanho e quantidade foi evidenciada pela microscopia confocal.

Após a fase lag foram realizadas sucessivas rampas de aquecimento e resfriamento as quais estão apresentadas na FIGURA 58. Nos gráficos de calorimétrico da amostra de XGJ nativa, observa-se na rampa de aquecimento que à temperatura de 38°C ocorre um evento exotérmico que pode estar relacionado à agregação das moléculas, o que é compatível com agregações laterais ou pela extremidade de cadeia polimérica, devido a uma maior interação polímero-polímero que polímero-solvente. De forma a corroborar com os resultados observados, Freitas e colaboradores (2015) também observaram que o aquecimento das amostras promovia um favorecimento de interações hidrofóbicas entre as cadeias de XGJ, através de segmentos desprovidos de galactose, que ocorrem naturalmente neste polissacarídeo.

Na rampa de resfriamento, um outro evento exotérmico foi identificado, este ocorreu à temperatura de 63°C . Segundo Freitas e colaboradores (2015) a formação de interações hidrofóbicas entre as moléculas de XGJ é mais evidenciada com o resfriamento, devido a um aumento das interações intermoleculares da rede reticulada, e pode estar associada a este evento exotérmico, mas em uma temperatura mais alta.

Na amostra de XGJ com Na_2SO_4 a $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ não foi observado um evento significativo durante a fase lag. Na FIGURA 58B, aonde estão agrupadas as sucessivas rampas de aquecimento e resfriamento, é observado, na primeira rampa de aquecimento, um aumento do fluxo de calor que pode estar relacionado à formação gradual da rede reticulada, ou seja, a gelificação paulatina do material. Na rampa de

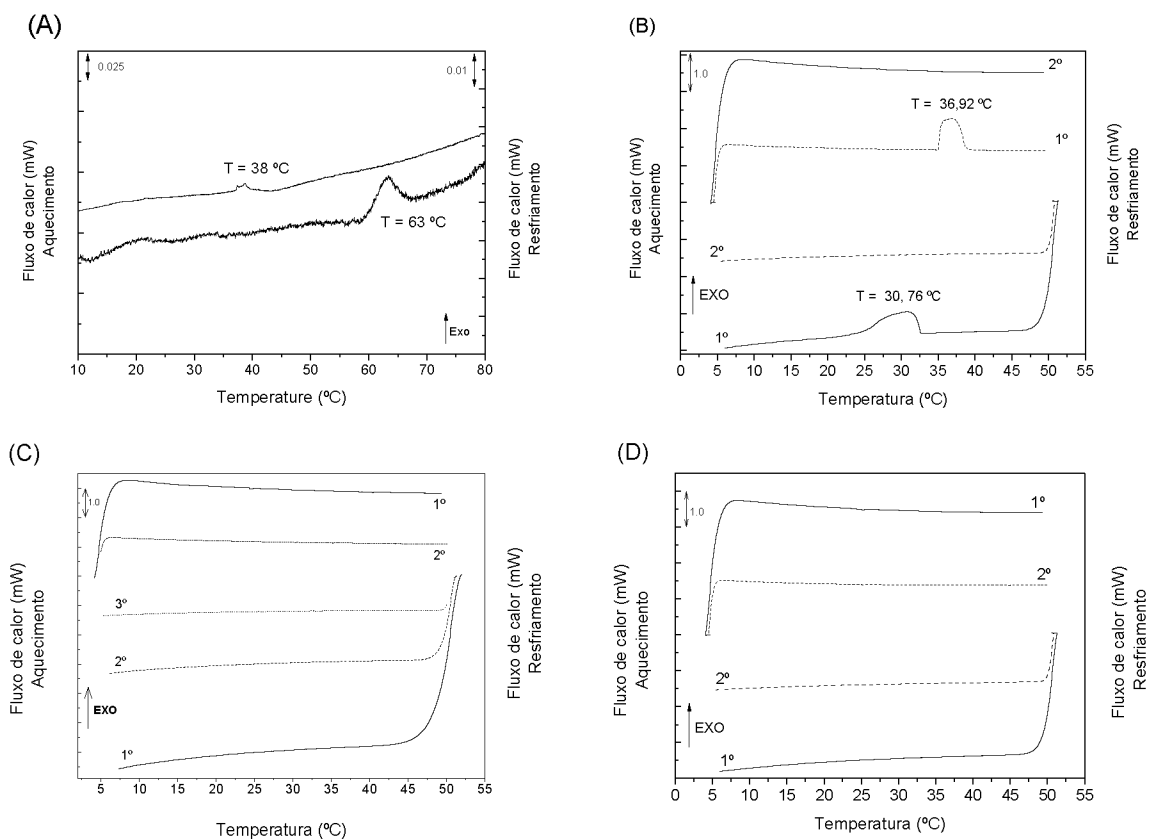
resfriamento ocorre um evento entálpico exotérmico em $T = 30,7\text{ }^{\circ}\text{C}$ referente à agregação, conforme foi observado para a mostra nativa. Na subsequente rampa de aquecimento sucede um novo aumento de fluxo, menor que o primeiro, além do aparecimento do evento exotérmico $T = 36,9\text{ }^{\circ}\text{C}$, provavelmente relacionado à decomposição do material.

As rampas de resfriamento e aquecimento da amostra de XGJ com Na_2SO_4 a $0,75\text{ mol L}^{-1}$ estão apresentadas na FIGURA 58C. Para esta amostra, foi realizada uma curva de resfriamento a mais, a qual evidenciou que o fluxo de calor diminui com o aumento do número de rampas. O que pode indicar que, quando ocorre a despercolação da rede reticulada, esta é refeita com uma densidade menor.

FIGURA 58 – PRIMEIRA RAMPA DE AQUECIMENTO (LINHA CONTINUA PRETA) E RESFRIAMENTO (LINHA CONTINUA AZUL); SEGUNDA RAMPA DE AQUECIMENTO (LINHA TRACEJADA PRETA) E RESFRIAMENTO (LINHA TRACEJADA AZUL) DAS AMOSTRAS XGJ NATIVA* (A); XGJ COM $0,5\text{ mol L}^{-1}$ (B); XGJ COM $0,75\text{ mol L}^{-1}$ (C)**; XGJ COM 1 mol L^{-1} (D). TAXA DE AQUECIMENTO $0,2\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$.

*APENAS A SEGUNDA RAMPA DE AQUECIMENTO E RESFRIAMENTO ESTÁ APRESENTADA

** UMA TERCEIRA RAMPA DE RESFRIAMENTO PARA ESTA AMOSTRA FOI REALIZADA (LINHA PONTILHADA AZUL)



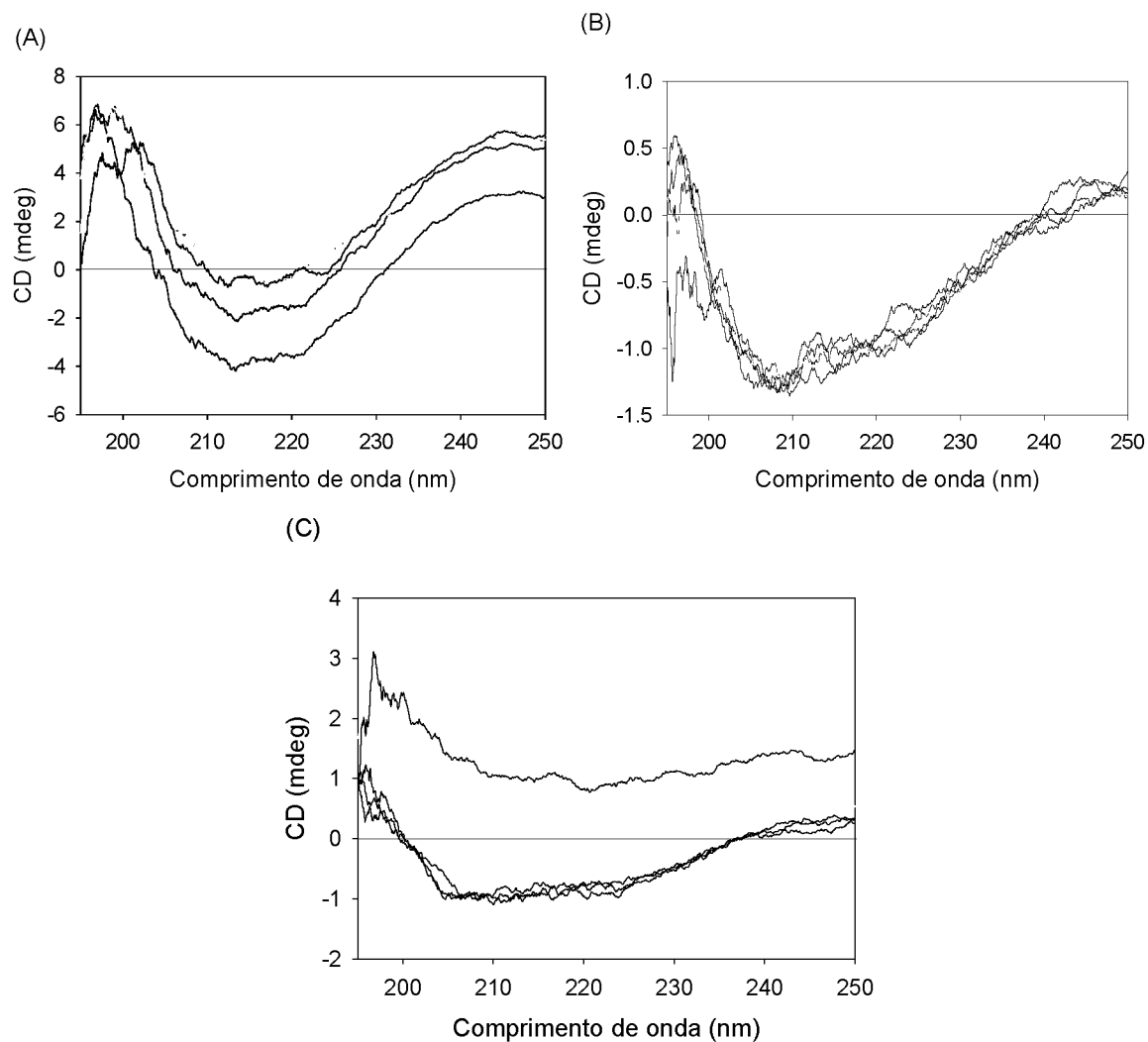
A amostra de XGJ com 1 mol L^{-1} apresentou o mesmo comportamento de diminuição do fluxo de calor detectado após sucessivas rampas de aquecimento e resfriamento. Entretanto, a diminuição não foi tão acentuada como ocorreu para a amostra com Na_2SO_4 a $0,75 \text{ mol L}^{-1}$. Acredita-se que essa variação do fluxo de calor esteja relacionada a percolação da rede e despercolação da mesma. As sucessivas rampas de aquecimento e resfriamento fazem com que estas ocorram em menor intensidade.

5.6 DICROISMO CIRCULAR

As análises de dicroísmo circular da XGJ nativa e com concentração de Na_2SO_4 a $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e 1 mol L^{-1} estão apresentadas na FIGURA 60. Os resultados mostram que, com o aumento da temperatura ocorre uma mudança na conformação da xiloglucana nativa. O acréscimo de sal à solução também influenciou na mudança da conformação da cadeia polimérica como pode-se observar comparando-se a figura 60B e 60C. O aumento da temperatura também teve um fator decisivo na mudança da conformação da cadeia para a amostra com XGJ com Na_2SO_4 1 mol L^{-1} , enquanto para a concentração menor isso não ocorreu.

Com base nos dados de dicroísmo circular e das análises físico-químicas apresentadas, podemos concluir que o acréscimo de um ânion cosmotrópico faz com que haja a remoção das moléculas de água presente na camada de solvatação, promovendo a mudança na conformação molecular, a qual faz com que as regiões hidrofóbicas naturalmente presentes na cadeia polimérica fiquem expostas. Com isso ocorre uma maior interação entre essas regiões hidrofóbicas levando à reticulação e formação da rede geleificação.

FIGURA 59 – ESPECTROS DE DICROÍSMO CIRCULAR DA XGJ NATIVA (A); XGJ COM Na_2SO_4 A $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ (B) E Na_2SO_4 A 1 mol L^{-1} (C). TEMPERATURA 10°C (LINHA PRETA); 20°C (LINHA VERMALHA); 30°C (LINHA VERDE); 40°C (LINHA AMARELA) E 50°C (LINHA AZUL).



6 CONCLUSÃO

Conclui-se, com estes resultados, que é possível induzir à gelificação da solução aquosa de xiloglucana de jatobá utilizando-se o sal cosmotrópico sulfato de sódio e um hidrogel termo-reversível pode ser formado acrescentando-se Na_2SO_4 a 1 mol L^{-1} à XGJ nativa. Entretanto, para a formação de um gel mais elástico e que não reverta ao estado sol, faz-se necessário manter o aquecimento da amostra por um tempo e/ou temperatura mais elevados, alterando assim a cinética de desagregação polimérica. O simples acréscimo do sal nesta solução, à temperatura ambiente, já é suficiente para promover uma maior interação entre as cadeias de xiloglucana, tornando a solução mais viscosa.

Em concentrações menores de Na_2SO_4 de $0,75 \text{ mol L}^{-1}$, $0,65 \text{ mol L}^{-1}$ e $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, foi possível obter hidrogéis que apresentassem termo-reversão dentro da escala de tempo e temperatura trabalhado nas análises reológicas. Entretanto faz-se necessário que estes permaneçam por mais tempo na temperatura de 50°C para que possa ocorrer a transição sol-gel. Contudo, esses géis formados são menos resistentes que o obtido em concentrações maiores. Em concentrações menores de Na_2SO_4 a $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ não houve a observação da formação do hidrogel nas condições avaliadas.

Dentre os ânions cosmotrópicos avaliados (SO_4^{2-} , HPO_4^{2-} , Cl^- , H_2PO_4^- , NO_3^-) os únicos que foram capazes de promover interações hidrofóbicas entre as cadeias de xiloglucana e consequente formação de pontos de reticulação, suficientes ao passo de promover a formação da rede gelificada estável foram os SO_4^{2-} e HPO_4^{2-} . Sendo que dentre esses o SO_4^{2-} formou géis com componente elástico maior que o HPO_4^{2-} , todos avaliados a mesma concentração de 1 mol L^{-1} , ou seja, houve a formação de géis mais forte.

Nas análises de microscopia confocal por varredura a laser foi possível avaliar qualitativamente a formação da rede gelificada, variando-se a temperatura e o tempo de formação. Grandes agregados e microfibrilas foram observados na composição da rede gelificada da XGJ com Na_2SO_4 a 1 mol L^{-1} enquanto nas demais apenas foi possível ver a formação de microfibrilas. Nas imagens de microscopia eletrônica de varredura o caráter dessas microfibrilas foram evidenciados, elas são formadas por pequenas partículas formadas pela interação entre as cadeias de xiloglucana que se ligam umas às outras.

Nas análises térmicas foi possível observar que a formação da rede gelificada da XGJ com Na_2SO_4 a 1 mol L^{-1} é diferente da constituição das menores. Enquanto a maior concentração apresenta um pico exotérmico na rampa de aquecimento até a fase lag, fase na qual a XGJ permanece durante 16 horas na temperatura de 50°C , as outras apenas uma transição de segunda ordem. Este pico exotérmico é referente a formação de grande agregado ou gelificação da rede, enquanto a transição de fase significa que a reação de formação da rede reticulada ocorre gradualmente. Esta formação gradual também foi observada na XGJ com Na_2SO_4 a 1 mol L^{-1} . Nas rampas de aquecimento e resfriamento, após fase lag, foi observado que ocorre a despercolação gradual dessas redes durante o resfriamento a qual se refaz durante a rampa de aquecimento. Rampas sucessivas mostraram que essa despercolação diminuiu.

A mudança de conformação após a adição do sal cosmotrópico à solução de XGJ foi observada nas análises de dicroísmo circular, com o aumento da concentração do sal adicionado, maior a mudança conformacional. Portanto, a mudança conformacional faz com que haja a exposição dos segmentos hidrofóbicos presentes naturalmente nas cadeias de XGJ. Foi esta exposição que tornou possível a interação das cadeias para a formação dos pontos de reticulação, sem que houvesse a necessidade de hidrólise enzimática para remover os segmentos hidrofílicos.

O trabalho teve como ponto de inovação a utilização de um sal higroscópico para a promoção da interação das cadeias de XGJ e formação da rede gelificada. As vantagens da utilização deste sal devem-se ao fato deste processo ser mais barato e mais simples que a utilização da enzima β -D-galactosidase, tornando mais viável economicamente a produção de hidrogéis termo-sensíveis ou termo-reversíveis de xiloglucana.

REFERÊNCIAS

- AEBISCHER, P.; WAHLBERG, L.; TRESCO, P. A. & WINN, S. R. Macroencapsulation of dopamine-secreting cells by coextrusion with an organic polymer solution. **Biomaterials**, v. 12, p. 50–56, 1991.
- AEBISCHER, P.; SCLUEP, M.; DEGLON, N.; JOSEPH, J.M.; HIRT, L.; HEYD, B.; GODDARD, M.; HAMMANG, J.P.; ZURN, A.D.; KATO, A.C.; REGLI, F.; BAETGE, E.E. Intrathecal delivery of CNTF using encapsulated genetically modified xenogeneic cells in amyotrophic lateral sclerosis patients. **Nat. Med.**, v. 2, p. 696–699, 1996.
- ALCÂNTARA, P. H. N.; MARTIN, L.; SILVA, C. O.; DIETRICH, S. M. C. & BUCKERIDGE, M. S. (2006). Purification of a beta-galactosidase from cotyledons of *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae). Enzyme properties and biological function. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 44, p. 619–627, 2006.
- ALMEIDA, N.; RAKESH, L.; ZHAO, J. Phase behavior of concentrated hydroxypropyl methylcellulose solution in the presence of mono and divalent salt. **Carbohydrate Polymers**, v. 99, p. 630–637, 2014a.
- ALMEIDA, N.; RAKESH, L.; ZHAO, J. Monovalente and divalent salt effects on thermogelation of aqueous Hypromellose solutions. **Food Hydrocolloids**, v. 36, p. 323–331, 2014b.
- ARAKAWA, T.; TIMASHEFF, S. N. Mechanism of poly(ethylene glycol) interaction with proteins. **Biochemistry**, v. 24, p. 6756– 6762, 1985.
- ARNTFIELD, S. D.; MURRAY, E. D. The Influence of Processing Parameters on Food protein Functionality I. Differential Scanning Calorimetry as an Indicator of Protein Denaturation. **Canadian Institute of Food Science and Technology Journal**, v. 14, Issue 4, p. 289–294, 1981.
- ARRUDA, I. R. S.; ALBUQUERQUE, P. B. S.; SANTOS, G. R. C.; SILVA, A. G.; MOURÃO, P. A. S.; CORREIA, M. T. S.; VICENTE, A. A.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G. Structure and rheological properties of a xyloglucan extracted from *Hymenaea courbaril* var. *courbaril* seeds. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 73, n. p. 31–38, 2015.
- BOCHOT, A.; FATTAL, E.; GROSSIORD, J. L.; PUISIEUX, F.; COUVREUR, P. Characterization of a new ocular delivery system based on a dispersion of liposomes in a thermosensitive gel. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 162, p. 119–127, 1998.
- BAE, Y.; HUH, K.; KIM, Y.; PARK, K. Biodegradable amphiphilic multiblock copolymers and their implications for biomedical applications. **Journal of Controlled Release**, v. 64 No.1–3, p. 3–13, 2000.
- BARBUCCI, R.; LAMPONI, S.; BORZACCHIELLO, A.; AMBROSIO, L.; FINI, M.; TORRICELLI, P., et al. Hyaluronic acid hydrogel in the treatment of osteoarthritis. **Biomaterials**, v. 23, p. 4503–4513, 2002.

BARNES, H. A.; HUTTON, J. F.; WALTERS, K. An introduction to rheology. **Elsevier**, v. 3, 1989.

BELDER, A. N.; GRANATH, K. Preparation and properties of fluorescein-labelled dextrans. **Carbohydrate Research**, v. 30, No 2, p. 375–378, 1973.

BELL, C. L. & PEPPAS, N. A. Water, solute and protein diffusion in physiologically responsive hydrogels of poly (methacrylic acid-g-ethylene glycol). **Biomaterials**, v. 17, p. 1203-18, 1996.

BRUN-GRAEPI, A. K. A. S.; RICHAR, C.; BESSODES, M.; SCHERMAN, D.; NARITA, T.; DUCOURET, G. & MERTEN, O. W. Study on the sol-gel transition of xyloglucan hydrogels. **Carbohydrate polymers**, v. 80, p. 555-562, 2010.

BORS, W.; MICHEL, C. Antioxidant capacity of flavanols and gallate esters: pulse radiolysis studies. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 27, No 11, p. 1413-1426, 1999.

BUCKERIDGE, M. S.; CROMBIE, H. J.; MENDES, C. J. M.; REID, J. S. G.; GIDLEY, M. J. & VIEIRA, C.C.J. A new family of oligosaccharides from the xyloglucan of *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae) cotyledons. **Carbohydrate Research**, v. 303, p. 233-237, 1997.

BURGALASSI, S.; CHETONI, P.; PANICHI, L.; BOLDRINI, E.; SAETTONE, M. F. Xyloglucan as a novel vehicle for timolol: Pharmacokinetics and pressure lowering activity in rabbits. **Journal Ocular Pharmacology and Therapeutics**, v. 16, p. 497–509, 2000.

BURGALASSI, S.; CHETONI, P.; PANICHI, L.; BOLDRINI, E.; SAETTONE, M.F. Xyloglucan as a novel vehicle for timol: pharmacokinetics and pressure lowering activity in rabbits. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, v. 16, p. 497-509, 2009.

BUSATO, A. P.; REICHER, F.; DOMINGUES, R.; SILVEIRA, J. L. M. Rheological properties of thermally xyloglucan gel from the seeds of *Hymenaea courbaril*. **Material Science Engineering C**, v. 29, p. 410–414, 2009.

CARPITA, N.C.; GIBEAUT, D.M. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. **Plant Journal**, v. 3, p. 1-30, 1993.

CARPITA, N.; MCCANN, M. The cell wall. In: BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. (ED). **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. **American Society of Plant Physiologist**, Maryland, 2000.

CAVICCHI, R. E.; POIRIER, G. E.; TEA, N. H.; AFRIDI, M.; BERNING, D.; HEFNER, A.; SUEHLE, J.; GAITAN, M.; SEMANCIK, S.; MONTGOMERY, C. Micro-differential scanning calorimeter for combustible gas sensing. **Sensors and Actuators**, v. 97, Issue 1, p. 22-30, 2004.

CERDEIRIÑA, C. A.; MÍGUEZ, J. A.; CARBALLO, E.; TOVAR, C. A.; DE LA PUENTE, E.; ROMANÍ, L. Highly precise determination of the heat capacity of liquids by DSC: calibration and measurement. **Thermochimica Acta**, v. 347, p. 37-44, 2000.

CHEN, M.; PAN, X.; WU, H.; HAN, K.; XIE, X.; WEDGE, D. E.; REPKA, M. A.; WU, C. Preparation and anti-bacterial properties of a temperature-sensitive gel containing silver nanoparticles. **Pharmazie**, v. 66, No 4, p. 272–277, 2011a.

CHEN, M.; YANG, Z.; WU, H.; PAN, X.; XIE, X.; WU, C. Antimicrobial activity and the mechanism of silver nanoparticle thermosensitive gel. **International Journal of Nanomedicine**, v. 6, p. 2873–2877, 2011b.

CHENITE, A.; CHAPUT, C.; WANG, D.; COMBES, C.; BUSCHMANN, M. D.; HOEMANN, C. D.; LEROUX, J. C.; ATKINSON, B. L.; BINETTE, F.; SELMANI, A. Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ. **Biomaterials**, v. 21, p. 2155–2161, 2000.

CHO, J.; HEUZEY, M.-C.; BEGIN, A.; CARREAU, P.J.; Physical gelation of chitosan in the presence of β -glycerophosphate: the effect of temperature. *Biomacromolecules*, v. 6, p. 3267–3275, 2005.

COHN, D.; SOSNIK, A.; LEVY, A. Improved reverse thermo-responsive polymeric systems. **Biomaterials**, v. 24, p. 3707–3714, 2003.

COVIELLO, T.; MATRICARDI, P.; MARIANECCI, C.; ALHAIQUE, F. Polysaccharide hydrogels for modified release formulations. **Journal control release**, v. 119, p. 5-24, 2007.

CROMPTON, K. E.; PRANKERD, R. J.; PAGANIN, D. M.; SCOTT, T. F.; HORNE, M. K.; FINKELSTEIN, D. I., et al. Morphology and gelation of thermosensitive chitosan hydrogels. **Biophysical Chemistry**, v. 117, p. 43–49, 2005.

CURLEY, C.; HAYESA, J. C.; ROWANA, N. J.; KENNEDY, J.E. An evaluation of the thermal and mechanical properties of a salt-modified polyvinyl alcohol hydrogel for a knee meniscus application. **Journal of the mechanical behavior of biomedical materials**, v. 40, p. 13–22, 2014.

CURY, A. J.; TENUTA, L. M. A.; TABCHOURY, C. M. Bioquímica Oral: Série Abeno: Odontologia Essencial - Parte Básica. **Artes médicas**, 2017.

DAI, J.; WU, Y.; CHENG, S.W.; ZHU, S.; YIN, H.P.; WANG, M.; TANG, J. Sugar compositional determination of polysaccharides from *Dunaliella salina* by modified RP-HPLC method of precolumn derivatization with 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone. **Carbohydrate polymers**, v. 82, p. 629-635, 2010.

DEVINE, D.; HIGGINBOTHAM, C. The synthesis of a physically crosslinked NVP based hydrogel. **Polymer**, v. 44, No. 26, p. 7851-7860, 2003.

DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. Microscopia eletrônica de varredura : aplicações e preparação de amostras : materiais poliméricos, metálicos e semicondutores [recurso eletrônico] – Porto Alegre : EDIPUCRS, 2007

DUMITRIU, S. Polymeric Biomaterials, Revised and Expanded. **Marcel Dekker Inc.**, New Your, 2002.

EMERICH, D. F.; WINN, S. R.; CHRISTENSON, L.; PALMATIER, M. A.; GENTILE, F. R.; SANBERG, P. R. A novel approach to neural transplantation in Parkinson's disease: use of polymer-encapsulated cell therapy. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 16, p. 437–447, 1992.

FANG, Y.; NISHINARI, K. Gelation behaviors of schizophyllan-sorbitol aqueous solutions. **Biopolymers**, v. 73, p. 44–60, 2004.

FRANK, H. S.; EVANS, M. W. Free volume and entropy in condensed systems. **J. Chem. Phys.**, v. 13, p. 507–532, 1945.

FREITAS, R. A.; GORIN, P. A. J.; NEVES, J.; SIERAKOWSKI, M. R. A rheological description of mixtures of a galactoxyloglucan with high amylose and waxy corn starches. **Carbohydrate Polymers**, v. 51, n. 1, p. 25-32, 2003.

FREITAS, R. A.; MARTIN, S.; SANTOS, G.; L.; VALENGA, F.; BUCKERIDGE, M.; S., REICHER, F.; SIERAKOWSKI, M.-R. Physico-chemical properties of seed xyloglucans from different sources. **Carbohydrate Polymers**, v. 60, p. 507-514, 2005.

FREITAS, R. A.; BUSATO, A. P.; MITCHEL, D. A.; SILVEIRA, J.L.M. Degalactosylation of xyloglucan: Effect on aggregation and conformation, as determined by time dependent static light scattering, HPSEC MALLS and viscosimetry. **Carbohydrate polymers**, v. 83, p. 1636-1642, 2011.

FREITAS, R. A.; SPIER, V. C.; SIERAKOWSKI, M. R.; NICOLAI, T.; BENYAHIA, L.; CHASSENIEUX, C. Transient and quasi-permanent networks in xyloglucan solutions. **Carbohydrate polymer**, v. 129, p. 216-223, 2015.

FRY, S. C.; YORK, W. S.; ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A.; HAYASHI, T.; JOSELEAU, J.-P.; KATO, Y.; LORENCES, E. P.; MACLACHLAN, G. A.; MCNEIL, M.; MORT, A. J.; REID, J. S.; SEITZ, H. U.; SELVENDRAN, R. R.; VORAGEN, A. G. J.; WHITE, A. R. An unambiguous nomenclature for xyloglucan-derived oligosaccharides. **Physiologia Plantarum**, v. 89, p. 1-3, 1993.

FUNAMI, T.; NISHINARI, K. Gelling characteristics of curdlan aqueous dispersions in the presence of salts. **Food Hydrocolloids**, v. 21, p. 59-65, 2007.

GALINSKI, E. A. Compatible solutes of halophilic eubacteria: molecular principles, water-solute interaction, stress protection. **Experientia**, v. 49, p. 487– 496, 1993.

GALINSKI, E. A.; STEIN, M.; AMENDT, B.; KINDER, M. The kosmotropic (structure-forming) effect of compensatory solutes. **Comp. Biochem. Physiol.**, 117A, p.357–365, 1997.

GANGULY, S.; DASH, A. K. A novel in situ gel for sustained drug delivery and targeting. **Int. J. Pharm.**, v. 276, p. 83–92, 2004.

GHELARDI, E.; TAVANTI, A.; DAVINI, P.; CELANDRONI, F.; SALVETTI, S.; PARISIO, E.; BOLDRINI, E.; SENESI S.; CAMPA, M. A Mucoadhesive Polymer

Extracted from Tamarind Seed Improves the Intraocular Penetration and Efficacy of Rufloxacin in Topical Treatment of Experimental Bacterial Keratitis. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, p. 3396-3401, 2004.

GRAESSLEY, W.W. Viscoelasticity and flow in polymer melts and concentrated solutions. **Phys Prop of Polym**, p. 97-153, 1984.

GREENFIELD, N.J. Using Circular Dichroism spectra to estimate protein secondary structure. **Nat. Protoc.**, v. 1(6), p. 2876-2890, 2006.

GORDON, S.; TEICHMANN, E.; YOUNG, K.; FINNIE, K.; RADES, T.; HOOK, S. In vitro and in vivo investigation of thermosensitive chitosan hydrogels containing silica nanoparticles for vaccine delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, p. 360–368, 2010.

HAUSEN, B. M.; BEYER, W. The sensitizing capacity of the antioxidants propyl, octyl, and dodecyl gallate and some related gallic acid esters. **Contact Dermatitis**, v. 26, No 4, p. 253-258, 1992.

HAYASHI, T. Xyloglucans in the primary cell wall. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 40, p. 139–168, 1989.

HAYASHI, T.; OGAWA, K.; MITSUISHI, Y. Characterization of the adsorption of xyloglucan to cellulose. **Plant Cell Physiology**, v. 35, p. 1199-1205, 1994.

HE, C.; KIM, S.; LEE, D. In situ gelling stimuli-sensitive block copolymer hydrogels for drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 127, No. 3, p.189-207, 2008.

HESKINS, M.; GUILLET, J. E. Solution properties of poly(N-isopropylacrylamide). **J. Macromol. Sci. Chem.**, p. 1441–1455, 1968.

HIRUN, N.; TANTISHAIYAKUL, V.; PICHAYAKORN, W. Effect of Eriochrome Black T on the gelatinization of xyloglucan investigated using rheological measurement and release behavior of Eriochrome Black T from xyloglucan gel matrices. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 388, p. 196-201, 2010.

HIRUN, N.; BAO, H.; LI, L.; DEENC, G. R.; TANTISHAIYAKUL, V. Micro-DSC, rheological and NMR investigations of the gelation of gallic acid and xyloglucan. **Soft Matter**, v. 8, p. 7258–7268, 2012.

HIRUN, N.; TANTISHAIYAKUL, V.; SANGFAI, T.; RUGMAI, S.; SOONTARANON, S. Nano-structure, phase transition and morphology of gallic acid and xyloglucan hydrogel. **Polym. Bull**, v. 73, p. 2211–2226, 2016.

HOARE, T. R.; KOHANE, D. S. Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. **Polymer**, v. 49, p.1993–2007, 2008.

HOFFMAN, A. S. Intelligent polymers, in: Park, K.; Kakihana, M. **Journal Sol-Gel Sci. Technol.**, v. 6, p. 7–55, 1996.

HOFFMAN, A. S. Hydrogels for biomedical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. 3-12, 2002.

ITOH, K.; YAHABA, M.; TAKAHASHI, A.; TSURUYA, R.; MIYAZAKI, S.; DAIRAKU, M.; TOGASHI, M.; MIKAMI, R.; ATTWOOD, D. In situ gelling xyloglucan/pectin formulations for oral sustained drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 356, p. 95–101, 2008.

JÓ, T. A.; PETRI, D. F. S.; BELTRAMINIC, L. M.; LUCYSZYND, N.; SIERAKOWSKID, M. R. Xyloglucan nano-aggregates: Physico-chemical characterisation in buffer solution and potential application as a carrier for camptothecin, an anti-cancer drug. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, p. 355–362, 2010.

JOSHI, S. C. Sol-Gel Behavior of Hydroxypropyl Methylcellulose (HPMC) in Ionic Media Including Drug Release. **Materials**, v. 4, p. 1861–1905, 2011.

JONG, P. H. K.; WILSON, J. E.; NEILSON, G. W. Hydrophobic hydration of methane. **Mol. Phys.**, v. 91, p. 99–103, 1997.

KAKIHANA, M. Invited review “sol-gel” preparation of high temperature superconducting oxides. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 6, Issue 1, p. 7–55, 1996.

KAWASAKI, N.; OHKURA, R.; MIYAZAKI, S.; UNO, Y.; SUGIMOTO, S.; ATTWOOD, D. Thermally reversible xyloglucan gels as vehicles for oral drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 181, p. 227–234, 1999.

KIM, M.S.; PARK, J. S.; CHUN, H. J.; KIM, C.-H. Thermosensitive Hydrogels for Tissue Engineering. **Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 8, p. 117–123, 2011.

KLOUDA L.; MIKOS, A. G. Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 68, p. 34–45, 2008.

KUNZ, W.; HENLE, J.; NINHAM, B. W. ‘Zur Lehre von der Wirkung der Salze’ (about the science of the effect of salts): Franz Hofmeister's historical papers. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 9, p. 19–37, 2004.

KUNZ, W. Specific ion effects in colloidal and biological systems. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 15, p. 34–39, 2010.

LEBERMAN, R.; SOPER, A. K. Effect of high-salt concentrations on water structure. **Nature**, v. 378, p. 364–366, 1995.

Li, L.; Thangamathesvaran, P. M.; Yue, C. Y.; Tam, K. C.; Hu, X.; Lam, Y. C. Gel network structure of methylcellulose in water. **Langmuir**, v. 17, p. 8062–8068, 2001.

LI, L.; SHAN, H.; YUE, C. Y.; LAM, Y. C.; TAM, K. C.; HU, X. Thermally induced association and dissociation of methylcellulose in aqueous solutions. **Langmuir**, v. 18, p. 7291–7298, 2002.

LIMA, D. U.; BUCKERIDGE, M. S. A xyloglucan from the seeds of the native Brazilian species *Hymenaea courbaril* for micropropagation of marubakaido and Jonagored apples. **Carbohydrate Polymers**, v. 46, p. 157–163, 2001a.

LIMA, D. U.; BUCKERIDGE, M. S. Interaction between cellulose and storage xyloglucans: the influence of the degree of galactosylation. **Carbohydr. Polym.**, v. 46, p. 157–163, 2001b.

LIMA-NISHIMURA, N.; REICHER, F.; CORREA, J. B. C.; SIERAKOWSKI, M.R. Partial structure of xyloglucan from the seeds of *Hymenaea courbaril* var. stilbocarpa (Jatoba). **Ciencia e Cultura**, v. 45, p. 22-26, 1993.

LIMA-NISHIMURA, N. ; REICHER, F. ; CORREA, J. B. C. ; GANTER, J. L. M. S. ; SIERAKOWSKI, M. R. Oligosaccharides derived from the xyloglucan isolated from the seeds of *Hymenaea courbaril* var. Stilbocarpa. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 17, p. 413-415, 1995.

LIMA-NISHIMURA, N. ; QUOIRIN, M. ; NADDAF, Y. G. ; WILHELM, H. M. ; RIBAS, L. L. F. ; SIERAKOWSKI, M.-R. A xyloglucan from the seeds of the native Brazilian species *Hymenaea courbaril* for micropropagation of marubakaido and Jonagored apples. **Plant Cell Reports**, v. 21, p. 402–407, 2003.

LIU, Y. Y.; SHAO, Y. H.; LÜ, J. Preparation, properties and controlled release behaviors os pH-induced thermosensitive amphiphilic gels. **Biomaterials**, v. 27, p. 4016-4024, 2006.

LUCAS, E.F.; SOARES, B.G.; MONTEIRO, E.E.C. **Caracterização de polímeros – Determinação de Peso Molecular e Análise Térmica**. Rio de Janeiro – Ed, e-papers, 366p., 2001.

LUDWIG, R. Water: from clusters to the bulk. **Angew. Chem. Int.**, v. 40, p. 1808–1827, 2001.

LYND, L. R.; WYMAN, C. E.; GERNGROSS, T. U. Biocommodity engineering. **Biotechnol. Progress**, v. 15, p. 777-793, 1999.

MAHAJAN, H. S.; TYAGI, V.; LOHIYA, G.; NERKAR, P. Thermally reversible xyloglucan gels as vehicles for nasal drug delivery. **Drug Delivery**, v. 19, No 5, p. 270–276, 2012.

MAHAJAN, H. S.; GUNDARE, S. A. Preparation, characterization and pulmonary pharmacokinetics of xyloglucan microspheres as dry powder inhalation. **Carbohydrate Polymers**, v. 102, p. 529–536, 2014.

MALISKA, A. M. Microscopia eletrônica de varredura [Material Eletrônico]. Universidade Federal De Santa Catarina – UFSC; Departamento De Engenharia Mecânica – EMC; Laboratorio De Materiais – LABMAT; **Laboratório De Caracterização Microestrutural E Análise De Imagens – LCMAI**. 2018

MARK, J. et.al., Propriedades Físicas de Polímeros. **American Chemical Society**, p. 102, 1984

MENCZEL, J. D.; PRIME, R. B. Thermal Analysis of Polymers – Fundamentals and Applications. **Wiley – A John Wiley & SONS, Inc. Publication**, 2009.

MIAO, T.; WANG, J.; ZENG, Y.; LIU, G.; CHEN, X. Polysaccharide-Based Controlled Release Systems for Therapeutics Delivery and Tissue Engineering: From Bench to Bedside. **Adv.Sci**, v. 5, p. 1-32, 2018.

MIYAZAKI, S.; SUISHA, F.; KAWASAKI, N.; SHIRAKAWA, M.; YAMATOYA, K.; ATTWOOD, D. Thermally reversible xyloglucan gels as vehicles for rectal drug delivery. **Journal Control. Release**, v. 56, p. 75-83, 1998.

MIYAZAKI, S.; ENDO, K.; KAWASAKI, N.; KUBO, W.; WATANABE, H.; ATTWOOD, D. Oral sustained delivery of paracetamol from in situ gelling xyloglucan formulations. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 29, p. 113–119, 2003.

MIYAZAKI, N.; KAWASAKI, N.; ENDO, K.; ATTWOOD, D. Oral sustained delivery of theophylline from thermally reversible xyloglucan gels in rabbits. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 53, p. 1185–1191, 2001a.

MIYAZAKI, S.; KAWASAKI, N.; SHIRAKAWA, M.; KUBO, W.; ENDO, K.; ATTWOOD, D. Comparison of in situ gelling formulations for the oral delivery of cimetidine. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 220, p. 161–168, 2001b.

MOELBERTA, S.; NORMAND, B.; LOS RIOS, P. DE. Kosmotropes and chaotropes: modelling preferential exclusion, binding and aggregate stability. **Biophysical Chemistry**, v. 112, p. 45– 57, 2004.

MURAMATSU, K.; ISEMURA, M.; SUGIYAMA, K.; YAMAMOTO, M. Health Science of Tea. **Japan Scientific Societies Press**, Tokyo, 2002.

MURAKAMI, L. M. Z.; RULLER, R. **Memorando técnico**: Uso da técnica de dicroísmo circular para avaliação de proteínas com aplicações biotecnológicas. Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol, 2016.

NAMIKI, K.; YAMANAKA, M.; TATEYAMA, C.; IGARASHI, M.; NAMIKI, M. Platelet-aggregation inhibitory activity of tea extracts. **Journal of the Japanese society for food science and technology**, v. 38, p. 189-195, 1991.

NISBET, D. R.; CROMPTON, K. E.; HAMILTON, S. D.; SHIRAKAWA, S.; PRANKERD, R. J.; FINKELSTEIN, D. I. Morphology and gelation of thermosensitive xyloglucan hydrogels. **Biophysical Chemistry**, v. 121, p. 14–20, 2006.

NISBET, D. R.; RODDA, A. E.; HORNE, M. K.; FORSYTHE, J. S.; FINKELSTEIN, D. I. Implantation of functionalized thermally gelling xyloglucan hydrogel within the brain: associated neurite infiltration and inflammatory response. **Tissue Eng Part A**, v. 16, No. 9, p. 2833-42, 2010.

NITTA, Y.; FANG, Y.; TAKEMASA, M.; NISHINARI, K. Gelation of Xyloglucan by Addition of Epigallocatechin Gallate as Studied by Rheology and Differential Scanning Calorimetry. **Biomacromolecules**, v. 5, p. 1206-1213, 2004.

NITTA, Y. **Gelation and Gel Properties of Gellan Gum and Xyloglucan**. Department of Food and Human Health Sciences Graduate School of Human Life Science, Osaka City University, 2005.

NÚÑEZ-SANTIAGO, M. C.; TECANTE, A. Rheological and calorimetric study of the sol–gel transition of j-carrageenan. **Carbohydrate Polymers**, v. 69, p. 763–773, 2007.

PARK, J.; BAE, Y. Hydrogels based on poly(ethylene oxide) and poly(tetramethylene oxide) or poly(dimethyl siloxane): synthesis, characterization, in vitro protein adsorption and platelet adhesion. **Biomaterials**, v. 23, No. 8, p. 1797-1808, 2002.

PAŢACHIAL, S.; FLOREA, C.; FRIEDRICH, C.; THOMANN, Y. Tailoring of poly(vinyl alcohol) cryogels properties by salts addition. **Polymer Letters**, v. 3, p. 320–331, 2009.

PATEL, A.; MEQUANINT, K. Hydrogel Biomaterials, Biomedical Engineering Reza Fazel-Rezai, IntechOpen, DOI: 10.5772/24856. Available from: <https://www.intechopen.com/books/biomedical-engineering-frontiers-and-challenges/hydrogel-biomaterials>, 2011.

PRIVALOV, P. L.; GILL, S. J. Stability of protein structure and hydrophobic interaction, **Adv. Protein Chem.**, v. 39, p. 191– 234, 1988.

PEPPAS, N. A.; MIKOS, A. G. Preparation methods and structure of hydrogels. **Hydrogels in Medicine and Pharmacy**, v. 1, p. 1-25, 1986.

PEPPAS, N. A.; BURES, P.; LEOBANDUNG, W. & ICHIKAWA, H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, p. 27-46, 2000.

PERSTEMILIDIS, A.; SAXENA, A. M.; SOPER, A. K.; HEAD-GORDON, T.; GLAESER, R. M. Direct evidence for modified solvent structure within the hydration shell of a hydrophobic amino acid. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 93, p. 10769– 10774, 1996.

PETRINI, P.; FARE, S.; PIVA, A.; TANZI, M. C. Design, synthesis and properties of polyurethane hydrogels for tissue engineering. **Journal of Material Science Material Medicine**, v. 14, p. 683–686, 2003.

PLUMRIDGE, T. H.; WAIGH, R. D. Water structure theory and some implications for drug design. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 54, p. 1155–1179, 2002.

PRIVALOV, P. L.; GILL, S. J. Stability of protein structure and hydrophobic interaction. **Adv. Protein Chem.**, v. 39, p. 191– 234, 1988.

PONGSAWATMANIT, R.; TEMSIRIPONG, T.; IKEDA, S.; NISHINARI, K. Influence of tamarind seed xyloglucan on rheological properties and thermal stability of tapioca starch. **Journal of Food Engineering**, v. 77, p. 41–50, 2006.

QUIDEAU, S. Plant “polyphenolic” small molecules can induce a calorie restriction-mimetic life-span extension by activating sirtuins: will “polyphenols” someday be used as chemotherapeutic drugs in western medicine? **Chem-BioChem**, v. 5, No 4, p. 427-430, 2004.

RATNER, B.; HOFFMAN, A.; SCHOEN, F.; LEMONS, J. Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine. **Elsevier Academic Press**, 2004.

RATNER, B. D.; HOFFMAN, A. S. Synthetic Hydrogels for Biomedical Application. **American chemical society Symposium Series**, v. 31, p. 1–36, 1976.

REID, J.S.G.; EDWARDS, M.; DEA, I.C.M. apud in. PHILLIPS, G.O.; WEDLOCK, D. J.; WILLIAMS, P. A. Gums and stabilisers for the food industry 4. **IRL Press, Oxford**, p. 391, 1988.

REINER, M. The deborah number. **Physics today**, v. 17, n. 1, p. 62, 1964.

ROSIK, J. M.; YOSHII, F. Hydrogels and their medical applications. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms**, v. 151, p. 56-64, 1999.

RUEL-GARIÉPY, E.; CHENITE, A.; CHAPUT, C.; GUIRGUISA, S.; LEROUX, J.-C. Characterization of thermosensitive chitosan gels for the sustained delivery of drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 203, p. 89–98, 2000.

RUEL-GARIÉPY, E.; LEROUX, J.-C. In situ-forming hydrogels—review of temperature-sensitive systems. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, p. 409–426, 2004.

RUBINSTEIN, M.; COLBY, R. **Polymer Physics (Chemistry): USA**: Oxford University Press, 2003.

SAKAKIBARA, C. N.; SIERAKOWSKI, M. R.; CHASSENIEUX, C.; NICOLAI, T.; DE FREITAS, R. A. Xyloglucan gelation induced by enzymatic degalactosylation; kinetics and the effect of the molar mass. **Carbohydr Polym.**, v.174, p. 517-523, 2017.

SANO, M.; MIYATA, E.; TAMANO, S.; HAGIWARA, A.; ITO, N.; SHIRAI, T. Lack of carcinogenicity of tamarind seed polysaccharide in B6C3F1 mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 34, p. 463-467, 1996.

SANTOS, H.P.; PURGATTO, E.; MERCIER, H.; BUCKERIDGE, M.S. The control of storage xyloglucan mobilization in cotyledons of *Hymenaea courbaril*. **Plant Physiology**, v. 135, p. 1-13, 2004.

SCHILD, H. G. Poly(*N*-isopropylacrylamide): experiment, theory and application. **Prog Polym Sci.**, v. 17, p. 163–249, 1992.

SCHMALJOHANN, D.; OSWALD, J.; JØRGENSEN, B.; NITSCHKE, M.; BEYERLEIN, D.; WERNER, C. Thermo-responsive PNiAAm-g-PEG films for controlled cell detachment. **Biomacromolecules**, v. 4, No. 6, p.1733-1739, 2003.

BJOERN SCHOELER, B.; DELORME, N.; DOENCH, I.; SUKHORUKOV, G. B.; FERY, A.; GLINEL, K. Polyelectrolyte Films Based on Polysaccharides of Different Conformations: Effects on Multilayer Structure and Mechanical Properties. **Biomacromolecules**, V. 7, p. 2065-2071, 2006.

SCHRAMM, G. Reologia e reometria - fundamentos teóricos e práticos. **Artliber editora ltda**, 2006.

SCHRAMM, G. A Practical Approach to Rheology and Rheometry. **Gebrueder HAAKE GmbH, Karlsruhe**, Federal Republic of Germany, 1996.

SETARAM INSTRUMENTATION. **USER'S Manual**. Vers. 3.0, SetSoft 2000a.

SETARAM INSTRUMENTATION. **Micro DSC III specifications**. SetSoft 2000b.

SFDERLUND, T.; ZHU, K.; JUTILA, A.; KINNUNEN, P.K.J. Effects of betaine on the structural dynamics of thermomyces (Humicola) lanuginosa lipase, *Colloids Surf. Biointerfaces*, v. 26, p. 75–83, 2003.

SIMI, C. K.; ABRAHAM, T. E. Biodegradable biocompatible xyloglucan films for various applications. *Colloid Polym Sci*, v. 288, p. 297–306, 2010a.

SIMI, C. K.; ABRAHAM, T. E. Transparent xyloglucan–chitosan complex hydrogels for different applications. *Food Hydrocolloids*, v. 24, p. 72–80, 2010b.

NAYAK, N. S.; SOGALI, B. S.; THAKUR, R. S. Formulation and evaluation of pH triggered in situ ophthalmic gel of Moxifloxacin hydrochloride. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v. 4, Issue 2, p. 452–459, 2012.

SHIRAKAWA, M.; YAMATOYA, K.; NISHINARI, K. Tailoring of xyloglucan properties using an enzyme. *Food Hydrocolloids*, v. 12, p. 25–28, 1998.

SOMERO, G. N.; OSMOND, C. B.; BOLIS, C. L. Water and Life. **Springer Verlag**, Berlin, 1992.

SOUZA, C. F.; LUCYSZYNA, N.; WOEHL, M. A.; RIEGEL-VIDOTTI, I. C.; BORSALI, R.; SIERAKOWSKI, M. R. Property evaluations of dry-cast reconstituted bacterial cellulose/tamarind xyloglucan biocomposites. *Carbohydrate Polymers*, v. 93, p. 144–153, 2013.

SPIER, V. C.; SIERAKOWSKI, M. R.; IBRAHIM, A. T.; BAUM, J. C.; SILVEIRA, J. L. M.; FREITAS, R. A. Time-dependent viscometry study of endoglucanase action on xyloglucan: A real-time approach. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 81, p. 461–466, 2015.

SUISHA, F.; KAWASAKI, N.; MIYAZAKI, S.; SHIRAKAWA, M.; YAMATOYA, K.; SASAKI, M.; ATTWOOD, D. Xyloglucan gels as sustained release vehicles for the intraperitoneal administration of mitomycin C. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 172, p. 27–32, 1998.

TAKAHASHI, A.; SUZUKI, S.; KAWASAKI, N.; KUBO, W.; MIYAZAKI, S.; LOEBENBERG, R.; BACHYNSKY, J.; ATTWOOD, D. Percutaneous absorption of non-steroidal anti-inflammatory drugs from in situ gelling xyloglucan formulations in rats. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 246, 179–186, 2002.

TANNER, R.I.; WALTERS, K. **Rheology: An Historical Perspective**. Elsevier, Amsterdam, 1998.

TAYLOR, L. D.; CERANKOWSKI, L. D. Preparation of Films Exhibiting a Balanced Temperature Dependence to Permeation by Aqueous Solutions-A Study of Lower

Consolute Behavior. **Journal of Polymer Science Polymer: Chemistry Edition**, v. 13, p. 2551-2570, 1975.

TAYLOR, L. Herbal Secrets of the Rainforest. **Sage Press, Inc.**, 2nd edition, 2002.

TIMASHEFF, S. N. Water and Life, in: G.S. Somero (Ed.), Springer Verlag, Berlin, p. 70, 1992.

TIMASHEFF, S. N.; ARAKAWA, T. in: Creighton, T. E. Protein Structure: a Practical Approach. **IRL Press, Oxford**, p. 331, 1997.

VAN DER KAR, C. **Applications of circular dichroism (cd) spectroscopy as educational Tool for undergraduate students and monitoring Protein conformational changes induced by Ligand binding**. Dissertação (Mestrado em Química). The University of Texas at Arlington, Texas, 2012.

VINCKEN, J. P.; BELDMAN, G.; VORAGEN, A. G. J. Substrate specificity of endoglucanases: what determines xyloglucanase activity. **Carbohydr. Res.**, v. 298, p. 299-310, 1997.

WANG, X.; SONG, K. S.; GUO, Q. X.; TIAN, W. X. THE GALLOYL MOIETY OF GREEN TEA CATECHINS IS THE CRITICAL STRUCTURAL FEATURE to inhibit fatty-acid synthase. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, No 10, p. 2039-2047, 2003.

WINTER, H. H.; Chambon, F. Analysis of linear viscoelasticity of a crosslinking polymer at the gel point. **J. Rheol.**, v. 30, p. 367-382, 1986.

WRIGGERS, W. Circular Dichroism. **The University of Texas**. Disponível em: <http://biomachina.org/courses/structures/05.html>. 2015.

WUNDERLICH, B. Thermal Analysis. **Imprint: Academic Press**, p. 464, 1990.

YAACOBI, M.; BEN-NAIM, A. Solvophobic interaction. **J. Phys. Chem.**, v. 78, p. 175-178, 1974.

YAMATOYA, K.; SHIRAKAWA, M. Xyloglucan: structure, rheological properties, biological functions and enzymatic modification. **Curr Trends Polym Sci**, v. 8, p. 27-72, 2003.

YAN, Y.; TAKEMASA, M.; ZHAO, C.; YU, L.; NISHINARI, K. Structure-gelation research on gallate analogs and xyloglucan by rheology, thermal analysis and NMR. **Food Hydrocolloids**, v. 52, p. 447-459, 2016.

YANG, N.; ASHTON, J.; KASAPIS, S. The influence of chitosan on the structural properties of whey protein and wheat starch composite systems. **Food Chemistry**, v. 179, p. 60-67, 2015.

YIN, X.; HOFFMAN, A. S.; STAYTON, P. S. Poly(N-isopropylacrylamide-co-propylacrylic acid) copolymers that respond sharply to temperature and pH. **Biomacromolecules**, v. 7, p. 1381-1385, 2006.

YIN, W.; ZHANG, H.; LONG, H.; NISHINARI, K. Effects of the lyotropic series salts on the gelation of konjac glucomannan in aqueous solutions. *Carbohydrate Polymers*, v. 74, p. 68-78, 2008.

YUGUCHI, Y.; KUMAGAI, T.; WU, M.; HIROTSU, T.; HOSOKAWA, J. Gelation of xyloglucan in water/alcohol systems. **Cellulose**, v. 11, p. 20-208, 2004.

YUGUCHI, Y.; FUJIWARA, T.; MIWA, H.; SHIRAKAWA, M.; YAJIMA, H. Color Formation and Gelation of Xyloglucan Upon Addition of Iodine Solutions. **Macromol. Rapid Commun.**, v. 26, p. 1315-1319, 2005a.

YUGUCHI, Y.; HIROTSU, T.; HOSOKAWA, J. Structural characteristics of xyloglucan – Congo red aggregates as observed by small angle X-ray scattering. **Cellulose**, v. 12, p. 469-477, 2005b.

ZHANG, Y.; CREMER, P. S. Interactions between macromolecules and ions: the Hofmeister series. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 10, p. 658–663, 2006.

ZIELINSKI, B. A.; AEBISCHER, P. Chitosan as a matrix for mammalian cell encapsulation. **Biomaterials**, v. 15, p. 1049–1056, 1994.